

# **Multiphotonen-mikroskopische Untersuchung funktioneller Nierenparameter im Goldblatt-Hypertonie-Modell**

von Anna-Maria Margareta Hammer



Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Multiphotonen-mikroskopische Untersuchung funktioneller  
Nierenparameter im Goldblatt-Hypertonie-Modell**

von Anna-Maria Margareta Hammer

aus Roding

München 2017



Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. R. Wanke

Angefertigt am Institut für Physiologie der Universität Regensburg

Mentor: Univ.-Prof. Dr. H. Castrop



**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Wanke

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. Bianka Schulz

Tag der Promotion: 11. Februar 2017





Für meine Eltern



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Grundlagen der Nierenfunktion .....</b>	<b>2</b>
1.1.	Aufgaben der Niere .....	2
1.2.	Gefäßversorgung der Niere .....	2
1.3.	Struktur und Funktion der Niere .....	2
1.3.1.	Das Glomerulum .....	2
1.3.1.1.	Glomeruläre Filtrationsbarriere .....	3
1.3.1.2.	Glomeruläre Filtration .....	4
1.3.1.3.	Regulation der glomerulären Filtration .....	5
1.3.2.	Der Tubulusapparat .....	7
1.4.	Pathophysiologische Grundlagen der Proteinurie und Albuminurie.....	7
1.5.	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	9
1.5.1.	Das Effektorpeptid Angiotensin II und seine Rezeptoren.....	10
1.5.2.	Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.....	11
<b>2.</b>	<b>Pathophysiologie der unilateralen Nierenarterienstenose.....</b>	<b>12</b>
2.1.	Prävalenz der Nierenarterienstenose .....	13
2.2.	Ursachen einer Nierenarterienstenose .....	13
2.2.1.	Atherosklerotische Nierenarterienstenose .....	14
2.2.2.	Fibromuskuläre Dysplasie .....	14
2.3.	Klinische Hinweise auf das Vorliegen einer Nierenarterienstenose .....	15
<b>3.</b>	<b>Verlauf und Folgen einer unilateralen Nierenarterienstenose.....</b>	<b>16</b>
3.1.	Pathophysiologie der renovaskulären Hypertonie/Goldblatt-Hypertonie ..	18
3.1.1.	Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems .....	19
3.1.2.	Aktivierung des sympathischen Nervensystems .....	21
3.1.3.	Oxidativer Stress .....	22
3.2.	Pathophysiologie der ischämischen Nephropathie.....	22
<b>4.</b>	<b>Therapieziele bei unilateraler Nierenarterienstenose.....</b>	<b>24</b>
<b>5.</b>	<b>Therapieoptionen bei unilateraler Nierenarterienstenose .....</b>	<b>24</b>

5.1.	Medikamentöse Therapie .....	24
5.2.	Revaskularisierung .....	25
5.2.1.	Perkutane transluminale Angioplastie.....	25
5.2.2.	Chirurgische Revaskularisierung .....	25
6.	<b>Therapie der Nierenarterienstenose im Wandel der Zeit .....</b>	<b>26</b>
7.	<b>Aktuelle Therapieempfehlungen.....</b>	<b>27</b>
8.	<b>Untersuchung der Funktion und Morphologie des Nephrons im Tiermodell .....</b>	<b>28</b>
9.	<b>Einführung in die Multiphotonen-Mikroskopie.....</b>	<b>28</b>
9.1.	Grundlagen der konventionellen Ein-Photonen-Fluoreszenz-Mikroskopie und der konfokalen Mikroskopie .....	29
9.2.	Prinzip der Multiphotonen-Mikroskopie.....	30
9.3.	Vorteile der Multiphotonen-Mikroskopie verglichen mit der konventionellen konfokalen Mikroskopie.....	32
10.	<b>Methodische Vorarbeiten: Generierung eines geeigneten Rattenstamms für die Untersuchung des 2K1C-Modells mit Hilfe der Mulitphotonen-Mikroskopie .....</b>	<b>33</b>
III.	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>35</b>
IV.	<b>VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>36</b>
1.	<b>Material .....</b>	<b>36</b>
1.1.	Geräte .....	36
1.2.	Verbrauchsmaterial .....	37
1.3.	Chemikalien und Pharmazeutika.....	38
2.	<b>Methodische Vorarbeiten: Generierung eines geeigneten Rattenstamms für die Untersuchung des 2K1C-Modells mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie .....</b>	<b>40</b>
2.1.	Körpergewichtsentwicklung.....	40
2.2.	Blutdruckmessung .....	40
2.3.	GFR Bestimmung mittels transkutaner Messung.....	40
2.4.	Albuminausscheidung über den Urin.....	41
2.5.	Glomerulosklerose-Index .....	42
2.6.	Tiefe der Glomeruli unter der Nierenkapsel .....	43

<b>3.</b>	<b>Experimentelle Erzeugung einer Nierenarterienstenose .....</b>	<b>43</b>
3.1.	Chirurgische Implantation eines Stenoseklips .....	44
3.2.	Blutdruckmessungen .....	44
<b>4.</b>	<b>Seitenvergleichende Untersuchung der Nierenfunktion bei unilateralen Nierenarterienstenose .....</b>	<b>44</b>
4.1.	Chirurgische Vorbereitung des Versuchstiers .....	45
4.2.	Voraussetzungen des Multiphotonen-Mikroskops zur Nierenfunktionsmessung am narkotisierten Tier .....	45
4.3.	Visualisierung der Nierenstruktur und -funktion mittels Multiphotonen- Mikroskopie .....	46
4.4.	Messung der kapillären Flussgeschwindigkeit und des Blutflusses.....	46
4.4.1.	Bestimmung der Flussgeschwindigkeit und des Blutflusses in den peritubulären Kapillaren.....	46
4.4.2.	Ermittlung der Flussgeschwindigkeit und des Blutflusses in den glomerulären Kapillaren.....	47
4.4.3.	Messeinstellungen für die Flussgeschwindigkeits- und Flussbestimmung	47
4.5.	Messung der glomerulären Filtrationsrate des Einzelneurons (Einzelneuron-GFR).....	48
4.5.1.	Bestimmung der Einzelneuron-GFR im Seitenvergleich.....	48
4.5.2.	Messeinstellungen für die Bestimmung der Einzelneuron-GFR .....	49
4.6.	Bestimmung des glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin ( $GSC_A$ ) ..	49
4.6.1.	Messung des $GSC_A$ mittels Multiphotonen-Mikroskopie .....	49
4.6.2.	Messeinstellung für die Bestimmung der $GSC_A$ .....	50
4.6.3.	Dosierung und Aufreinigung des Farbstoffs FITC-Albumin.....	51
4.7.	Filtration von Albumin.....	51
4.8.	Ermittlung der Rückresorption von FITC-Albumin im S1-Segment des proximalen Tubulus.....	51
4.9.	Aus welcher Niere kommt das Albumin im Urin?.....	52
4.10.	Peritubuläre Extravasation .....	52
<b>5.</b>	<b>Albuminausscheidung über den Urin.....</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>Behandlung mit dem Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten Losartan .....</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>53</b>

<b>V.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>54</b>
<b>1.</b>	<b>Charakterisierung der F1-Generation der Kreuzungstiere aus MWF und Wistar Ratten.....</b>	<b>54</b>
1.1.	Bestimmung des Körpergewichts zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung .....	54
1.2.	Bestimmung der GFR in 6 Wochen und 6 Monate alten Tieren.....	55
1.3.	Blutdruckmessung .....	57
1.4.	Albuminausscheidung .....	59
1.5.	Glomerulosklerose-Index .....	60
1.6.	Tiefe der Glomeruli unter der Nierenkapsel .....	61
<b>2.</b>	<b>Hämodynamische Veränderungen im 2K1C-Modell .....</b>	<b>63</b>
2.1.	Blutdruck.....	63
2.1.1.	Systolischer Blutdruck mit der Tail-Cuff Methode.....	64
2.1.2.	Mittlerer arterieller Blutdruck unter Isoflurannarkose .....	65
2.2.	Peritubulär-kapilläre Blutflussgeschwindigkeit und Blutfluss.....	66
2.3.	Glomerulär-kapilläre Blutflussgeschwindigkeit und Blutfluss .....	68
<b>3.</b>	<b>Untersuchung weiterer funktioneller Parameter der Niere mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie .....</b>	<b>71</b>
3.1.	Einelnephron-GFR .....	71
3.2.	GSC <sub>A</sub> .....	73
3.3.	Filtration von Albumin.....	75
3.4.	Albuminrückresorption im S1-Segment des proximalen Tubulus.....	77
3.5.	Albuminausscheidung im Urin.....	79
3.6.	Aus welcher Niere kommt das Albumin im Urin?.....	81
3.4.	Permeabilität peritubulärer Gefäße .....	82
<b>VI.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>84</b>
<b>1.</b>	<b>Auswirkungen einer unilateralen Nierenarterienstenose auf den systemischen Blutdruck .....</b>	<b>84</b>
<b>2.</b>	<b>Akute Effekte einer unilateralen Nierenarterienstenose auf die Durchblutung der Niere.....</b>	<b>86</b>
<b>3.</b>	<b>Akute Effekte einer unilateralen Nierenarterienstenose auf die Albuminfiltration .....</b>	<b>88</b>
3.1.	Akute Effekte einer Nierenarterienstenose auf die Einelnephron-GFR ...	88

3.2.	Effekte auf den glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin .....	90
3.3.	Albuminfiltration im Two-Kidney-One-Clip-Modell .....	91
4.	<b>Akute Effekte einer unilateralen Nierenarterienstenose auf die Albuminrückresorption im proximalen Tubulus.....</b>	<b>92</b>
5.	<b>Akute Effekte einer unilateralen Nierenarterienstenose auf die Albuminausscheidung über den Urin.....</b>	<b>93</b>
6.	<b>Identifizierung der Herkunft des Albumins im Urin im Two-Kidney- One-Clip-Modell.....</b>	<b>94</b>
7.	<b>Effekte einer unilateralen Nierenarterienstenose auf die Permeabilität peritubulärer Gefäße .....</b>	<b>96</b>
VII.	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>98</b>
VIII.	<b>SUMMARY.....</b>	<b>100</b>
IX.	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>102</b>
X.	<b>ANHANG .....</b>	<b>122</b>
1.	<b>Publikationen.....</b>	<b>122</b>
2.	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
3.	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
4.	<b>Erklärungen zum Copyright .....</b>	<b>128</b>
XII.	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>129</b>





## **I. EINLEITUNG**

Eine Verengung der Nierenarterie, die in einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems resultiert, ist verantwortlich für eine Vielzahl von ernst zu nehmenden Folgeerkrankungen. Eine hämodynamisch relevante Nierenarterienstenose kann zur Manifestation einer Hypertonie und einer ischämischen Nephropathie führen. Wichtige Therapieziele bei Patienten mit einer Nierenarterienstenose sind der Erhalt der Nierenfunktion, die Behandlung des Bluthochdrucks, das Verhindern von Endorganschäden und eine Verringerung der kardiovaskulären Mortalität (Sturm, 2008). Obwohl in den letzten zwanzig Jahren große Fortschritte in der Diagnostik renovaskulärer Erkrankungen erzielt werden konnten, werden die verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten kontrovers diskutiert. Studien, die in den 1990er Jahren veröffentlicht wurden, zeigten positive Effekte einer invasiven Dilatation der Nierenarterienstenose auf den Krankheitsverlauf. Aus diesem Grund wurden diese Therapieverfahren in den Folgejahren vermehrt eingesetzt, obwohl sie mit schweren Komplikationen wie Dissektion, Nierenarterienverschluss, akutem Nierenversagen und Cholesterin-embolie einhergehen können. Die Vorteile einer Angioplastie gegenüber einer medikamentösen Hypertoniebehandlung wurden durch neuere Untersuchungen in Frage gestellt. In der CORAL-Studie (Cooper et al., 2014) konnte belegt werden, dass die endovaskuläre Therapie gegenüber der medikamentösen Therapie keine Vorteile für den Patienten bietet.

Aus diesem Grund wird die medikamentöse Therapie bei der Nierenarterienstenose wieder vermehrt eingesetzt. Zur medikamentösen Standardtherapie werden ACE-Hemmer, AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker und  $\beta$ -Blocker mit Erfolg bei Patienten mit unilateraler Nierenarterienstenose und Hypertonie eingesetzt.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente zur Evaluierung der Nierenfunktion nach experimenteller Induktion einer unilateralen Nierenarterienstenose in der Ratte durchgeführt und die Effekte einer Therapie mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker Losartan beleuchtet.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Grundlagen der Nierenfunktion**

#### **1.1. Aufgaben der Niere**

Die wichtigste Funktion der Nieren ist die Bildung des Harns. Dadurch wird die Ausscheidung von harnpflichtigen Stoffwechselendprodukten gewährleistet. Die Nieren sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Homöostase von Elektrolyten, wie zum Beispiel Natrium, Chlorid und Kalium beteiligt. Über die Regulation des Wasserhaushalts spielen sie eine wichtige Rolle für die Blutdruckregulation. Außerdem wird der Blutdruck durch die Produktion der Endopeptidase Renin beeinflusst. Die Nieren sind zudem Syntheseort weiterer Hormone, wie Erythropoetin und Calcitriol, die Einfluss auf die Blutbildung und den Knochenstoffwechsel nehmen (Pape et al., 2014).

#### **1.2. Gefäßversorgung der Niere**

Die arterielle Versorgung der Niere erfolgt über die A. renalis. Am Nierenhilus spaltet sich die A. renalis in mehrere Segmentarterien auf, welche sich wiederum in Aa. interlobares aufteilen. Diese verlaufen zwischen zwei Nierenpyramiden in Richtung der Nierenkapsel und spalten sich nacheinander in Aa. arcuatae und Aa. interlobulares auf, die senkrecht zur Nierenoberfläche verlaufen. Über die afferenten Arteriolen gelangt das arterielle Blut in ein erstes Kapillarbett, die Glomeruluskapillaren. Über die efferente Arteriole wird das Blut in ein zweites Kapillarbett, die peritubulären Kapillaren geführt. Der venöse Abfluss über die Vv. arcuatae, Vv. interlobulares und die V. renalis mündet schließlich in die Vena cava inferior (Pape et al., 2014).

#### **1.3. Struktur und Funktion der Niere**

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere stellt das Nephron dar. Es setzt sich aus dem Glomerulum und dem Tubulussystem zusammen.

##### **1.3.1. Das Glomerulum**

Die intraglomerulären Mesangiumszellen, Endothelzellen und die Podozyten bilden mit den glomerulären Kapillaren das Glomerulum. Zusammen mit der Bowman-Kapsel als einer Verlängerung der Epithelschicht des proximalen

Tubulus und dem Bowman-Raum entsteht das Corpusculum renale. Der Bowman-Raum wird auch als Harnraum bezeichnet. Im Corpusculum renale findet durch Ultrafiltration des Plasmas die Bildung des Primärharns statt. Durch die glomeruläre Filtrationsbarriere werden hochmolekulare Plasmaproteine und Blutzellen zurückgehalten.

Der Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere soll im Folgenden erläutert werden.

#### **1.3.1.1. Glomeruläre Filtrationsbarriere**

Die Filtrationsbarriere setzt sich aus verschiedenen Schichten zusammen:

- dem fenestrierten Endothel der glomerulären Kapillaren und ihrer negativ geladenen Glykokalix
- der glomerulären Basalmembran
- den Podozyten mit ihren Fußfortsätzen, die eine Schlitzmembran bilden.

(Gekle et al., 2015)

Durch das Zusammenspiel dieser drei Schichten wird eine selektive Filtration des Blutplasmas ermöglicht. Da die Glykokalix, die Basalmembran und die Schlitzporen eine negative Ladung tragen, ist neben der Größe die Ladung eines Moleküls entscheidend für seine Filtrationseigenschaften. Dies betrifft vor allem Substanzen mit einem Molekulargewicht zwischen 10 000 und 100 000 Da (Maack et al., 1992). Negativ geladenes Albumin mit einem molekularen Gewicht von 65 000 Da wird zum Beispiel in deutlich geringerem Umfang filtriert als gleichgroße, neutrale Moleküle (Haraldsson et al., 2008).

#### **Das fenestrierte Endothel**

Das Endothel kleidet die glomerulären Kapillaren aus und bildet somit die innerste, luminale Zellschicht. Glomeruläre Endothelzellen sind im Vergleich zu anderen Endothelzellen in der Herz- oder Skelettmuskulatur sehr flach und stark fenestriert. Diese Lücken, mit einer Größe von 60 nm, in der Basalmembran machen sie permeabel für Wasser und kleine Moleküle (Deen et al., 2001, Tisher, 1978). Albumin mit einem Durchmesser von 3,6 nm müsste das fenestrierte Endothel folglich problemlos überwinden. Es wird jedoch zum Teil durch diese Schicht der Filtrationsbarriere zurückgehalten. Die Glykokalix, die sich aus

negativ geladenen Glykoproteinen, Glukosaminoglykanen und Proteoglykanen zusammensetzt und dem Endothel luminal direkt aufliegt, scheint maßgeblich an der Ladungsselektivität der ersten Schicht der Filtrationsbarriere beteiligt zu sein (Haraldsson et al., 2008).

### **Die glomeruläre Basalmembran**

Die glomeruläre Basalmembran setzt sich aus einem fibrösen Netzwerk aus Kollagen Typ IV, Nidogen/Entactin, Laminin und Proteoglykanen zusammen. Die Basalmembran der glomerulären Kapillaren (240-370  $\mu\text{m}$ ) ist verglichen mit der Basalmembran anderer Kapillaren (40-80  $\mu\text{m}$ ) deutlich dicker (Simionescu and Antohe, 2006). Kollagen Typ IV bildet das Stützgerüst der glomerulären Basalmembran und Mutationen in diesem Kollagennetzwerk, wie sie beim Alport-Syndrom gefunden wurden, führen zu einer Proteinurie und Glomerulonephritis (Mochizuki et al., 1994). Die Heparinsulfat-konjugierten Proteoglykane sind zusammen mit der Glykokalix des fenestrierten Endothels für die Ladungsselektivität der Filtrationsbarriere verantwortlich (Hassell et al., 1980). Die glomeruläre Basalmembran spielt folglich eine zentrale Rolle für die Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere.

### **Die podozytäre Schlitzmembran**

Die Epithelzellen des Glomerulums, die als Podozyten bezeichnet werden, sind spezialisierte und hochdifferenzierte Zellen, die die glomerulären Kapillaren an der Außenseite umgeben und in den Harnraum ragen. Von ihrem großen Zellkörper gehen lange zytoplasmatische Fußfortsätze aus, die durch 25-60 nm breite Filtrationsschlitze voneinander getrennt sind (Salant, 1994). Die Filtrationsschlitze werden von einer dünnen, elektronendichten Membran überzogen, die als Schlitzmembran bezeichnet wird. Die porenähnliche Struktur der Schlitzmembran verhindert die Filtration von Albumin weitgehend (Haraldsson et al., 2008). Ist die Signaltransduktion in der Schlitzmembran gestört, führt dies zu einer Dysfunktion und Schädigung der Podozyten und zur Entstehung einer Proteinurie (Huber et al., 2003, Pavenstadt et al., 2003).

#### **1.3.1.2. Glomeruläre Filtration**

Die durchschnittliche glomeruläre Filtrationsrate (GFR) eines 70 kg schweren Menschen mit einer Körperoberfläche von 1,73  $\text{m}^2$  beträgt 120 ml/min bzw. 180 l/d. Die GFR setzt sich aus der Einzelnephron-GFR aller Glomeruli eines

Menschen bzw. Tieres zusammen. Um eine konstante GFR aufrechtzuerhalten, ist ein Blutfluss von ca. 1100 ml/min bzw. ein Plasmafluss von ca. 600 ml/min nötig. In den Glomeruli werden folglich ca. 20% des Plasmaflusses filtriert. Dies wird als Filtrationsfraktion bezeichnet. Der Organismus sorgt dafür, dass der renale Blutfluss relativ konstant gehalten wird, um diese hohen Filtrationsraten zu gewährleisten. Eine ausreichende Durchblutung der Niere werden durch einen niedrigen Sympathikotonus und eine hohe Produktion vasodilatatorisch wirksamer Substanzen wie NO aufrechterhalten (Schnermann and Sayegh, 1998).

Die treibende Kraft der glomerulären Filtration ist der effektive Filtrationsdruck. Der Filtrationsdruck ist vor allem abhängig vom hydrostatischen Druck in den glomerulären Kapillaren ( $P_{GC}$ ). Ihm wirkt der hydrostatische Druck in der Bowman-Kapsel ( $P_{Bow}$ ) und der kolloidosmotische Druck im Blut ( $\pi_{GC}$ ) entgegen. Da der onkotische Druck im Harnraum ( $\pi_{Bow}$ ) vernachlässigbar klein ist, errechnet sich der Filtrationsdruck ( $P_{eff}$ ) folgendermaßen:

$$P_{eff} = (P_{GC} - P_{Bow}) - (\pi_{GC} - \pi_{Bow}) = (48 - 13) - (25 - 0) = 10 \text{ mmHg}$$

(Pape et al., 2014).

Verglichen mit anderen Kapillaren ist der hydrostatische Druck in den glomerulären Kapillaren sehr hoch, da sich an das glomeruläre Kapillarbett ein Widerstandsgefäß, die efferente Arteriole, anschließt. Aus diesem Grund verändert sich die Druckdifferenz des hydrostatischen Drucks im Verlauf des glomerulären Kapillarbets kaum.

Verglichen mit anderen Kapillarbetten, sind die glomerulären Kapillaren 50-100-fach permeabler für Wasser.

Folglich ist die Filtrationsfraktion in den glomerulären Kapillaren mit 20% viel größer als in anderen Kapillaren, wie zum Beispiel in der Muskulatur (Filtrationsfraktion 1%). Aufgrund der hohen Filtrationsfraktion kommt es entlang der glomerulären Kapillaren zu einem wesentlichen Anstieg des onkotischen Drucks (Schnermann and Sayegh, 1998).

### 1.3.1.3. Regulation der glomerulären Filtration

Veränderungen der GFR können die Folge struktureller Veränderungen sein. Ein Anstieg der GFR kann zum Beispiel bei einer Hypertrophie der Niere beobachtet werden. Bei einem chronischen Nierenversagen hingegen fällt die GFR deutlich

ab.

Viel häufiger spiegelt eine Veränderung der GFR eine funktionelle Anpassung des Filtrationskoeffizienten oder des effektiven Filtrationsdrucks wider.

Der effektive Filtrationsdruck ist vom Widerstand der afferenten und efferenten Arteriole, dem Druck in der Nierenarterien, der Plasmaproteinkonzentration und dem renalen Plasmafluss abhängig. Auch tubuläre Obstruktionen können über eine Veränderung des hydrostatischen Drucks im Harnraum Einfluss auf den effektiven Filtrationsdruck haben.

Veränderungen des systemischen Blutdrucks können ebenfalls einen Einfluss auf den hydrostatischen Druck in der Nierenarterie haben. Leichte Schwankungen des Blutdrucks werden von autoregulatorischen Mechanismen abgefangen. Fällt der arterielle Blutdruck jedoch unter 80 mmHg, wie zum Beispiel während eines Schocks, so kann dies die Filtrationsleistung beeinträchtigen (Schnermann and Sayegh, 1998). Bei einer experimentellen Nierenarterienstenose wurden Druckgradienten von ca. 50 mmHg gemessen (Murphy et al., 1984). Folglich ist ein Einfluss auf den effektiven Filtrationsdruck und die GFR anzunehmen.

Das Bestreben der Niere, die glomeruläre Filtrationsrate konstant zu halten, wird als Autoregulation bezeichnet. Vor allem zwei Mechanismen sind an der Aufrechterhaltung des benötigten Widerstands in den Widerstandsgefäßen beteiligt: der myogene Mechanismus (Bayliss-Effekt) und der tubuloglomeruläre Feedback Mechanismus. Der myogene Effekt wird als kontraktile Eigenschaft der glatten Muskelzellen beschrieben, die durch eine Erhöhung der Gefäßwandspannung ausgelöst wird.

Auch der tubuloglomeruläre Feedback Mechanismus ist an der Regulation der Einzelnephron-GFR beteiligt. Bei einer erhöhten Natriumchloridkonzentration an der Macula wird dies durch die Aktivität des Na/K/2Cl<sup>-</sup> Kotransporters der Macula-densa-Zellen registriert und führt zu einer Zunahme der intrazellulären Chloridkonzentration. Daraufhin wird Adenosintriphosphat freigesetzt und zu Adenosin dephosphoryliert. An der afferenten Arteriole vermittelt Adenosin eine Vasokonstriktion und somit eine Abnahme der Einzelnephron-GFR (Castrop, 2016).

Diese beiden autoregulatorischen Mechanismen halten die GFR über eine

Regulierung des hydrostatischen Drucks in den glomerulären Kapillaren konstant. Dies hat zudem protektive Effekte auf die glomerulären Kapillaren. Ein gesteigerter hydrostatischer Druck in den glomerulären Kapillaren ist mit der Entwicklung pathologischer struktureller und funktioneller Veränderungen des Glomerulums assoziiert. Beispielsweise, kommt es in der Anfangsphase eines Diabetes mellitus zu einer Dilatation der afferenten Arteriole und folglich zu einem Anstieg des hydrostatischen Drucks in den glomerulären Kapillaren. Diese Tatsache wird unter anderem als Ursache glomerulärer Schädigung bei diesen Patienten gesehen (Schnermann and Sayegh, 1998).

### **1.3.2. Der Tubulusapparat**

Das Tubulussystem kann anhand von strukturellen und funktionellen Kriterien in mehrere Abschnitte unterteilt werden. Der Anfangsabschnitt wird als proximaler Tubulus mit Pars convoluta und Pars recta bezeichnet. Dort findet unter anderem die Resorption großer Mengen Natrium, Glukose und Bikarbonat statt. Proteine wie Albumin werden ebenfalls im proximalen Tubulus über Rezeptor-vermittelte (Megalin/Cubilin) Endozytose resorbiert. Außerdem können dort Protonen und Ammoniak sezerniert werden. Im Intermediärtubulus mit Pars descendens und Pars ascendens findet eine Konzentrierung des Harns mit Hilfe des Gegenstromprinzips statt. In der angrenzenden Pars recta und Pars convoluta des distalen Tubulus findet keine Wasserresorption statt. Im Verbindungstubulus und im Sammelrohr ist die Harnkonzentrierung ADH-abhängig (Pape et al., 2014, Schnermann and Sayegh, 1998).

### **1.4. Pathophysiologische Grundlagen der Proteinurie und Albuminurie**

Bei einer Vielzahl von Nierenerkrankungen kommt es zu einer vermehrten Ausscheidung von Proteinen ( $>150$  mg/d) im Harn. Sie wird als Proteinurie bezeichnet (Greten et al., 2010). Albumin ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung, da es quantitativ das wichtigste Plasmaprotein darstellt. Von einer Albuminurie spricht man, wenn die Albuminausscheidung mehr als 30 mg/d beträgt (Haraldsson et al., 2008). Unter physiologischen Bedingungen wird Albumin nur in sehr geringem Maße über den Urin ausgeschieden, da es als wichtiges Transportprotein im Blut an der Flüssigkeitsverteilung im Organismus beteiligt ist (Schmidt et al., 2005).

Auch eine unilaterale Nierenarterienstenose kann von einer gesteigerten Protein- und Albuminausscheidung begleitet sein. Eine Proteinurie ist ein Hauptsymptom für das Vorliegen intrarenaler Schädigung bei atherosklerotischen Veränderungen der Nierenarterie. Sie korreliert stark mit der Nierenfunktion und dem langfristigen Verlauf der Krankheit. Das Auftreten einer Proteinurie kann somit diagnostisch auch als Marker des Schweregrades einer Nierenarterienstenose genutzt werden. Mehr als 50% der Patienten, die an einer atherosklerotischen Nierenarterienstenose leiden, weisen eine Proteinurie auf. Des Weiteren konnten mehrere Studien eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Proteinurie und dem Abfall der Nierenfunktion zeigen. Makanjuola et al. ermittelten in Patienten mit einer GFR  $>50$  ml/min eine mittlere Proteinausscheidung von 400 mg/d. Patienten, bei denen die Nierenfunktion auf eine GFR unter 50 ml/min gesunken war, schieden deutlich größere Mengen Protein im Harn aus (500–2400 mg/d) (Makanjuola et al., 1999). Aufgrund dieser positiven Korrelation zwischen dem Abfall der GFR und der Proteinurie, kann der Grad der Proteinausscheidung im Harn auch als prognostischer Marker der Nierenfunktion genutzt werden (Hunsicker et al., 1997).

Nach ihrem Entstehungsort unterscheidet man zwei verschiedene Formen der renalen Proteinurie: die glomeruläre und die tubuläre Proteinurie. Sie sind von den extrarenalen Formen abzugrenzen.

Bei der glomerulären Proteinurie kommt es zu einer gesteigerten glomerulären Filtration von Plasmaproteinen, wie Albumin. Durch die Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere, können die Größen- und Ladungsselektivität des Filters beeinträchtigt sein (Chang et al., 1975). Ein Verlust der Ladungsselektivität führt zu einer vermehrten Ausscheidung von Albumin, wohingegen Globuline trotzdem zurückgehalten werden können. Geht die Größenselektivität des Filters verloren, werden sowohl Albumin als auch Globuline vermehrt ausgeschieden (Schnermann and Sayegh, 1998).

Unter einer tubulären Proteinurie versteht man die vermehrte Proteinausscheidung im Harn aufgrund einer Dysfunktion der Tubuluszellen, die zu einer mangelhaften Rückresorption normal glomerulär filtrierter Proteinmengen führt. Dies wird zum Beispiel beim Fanconi-Syndrom und einer Zystinose beobachtet (Pape et al., 2014). Unter physiologischen Bedingungen wird filtrierte Albumin im proximalen Tubulus (vor allem in das S1-Segment) nach Bindung an den



Megalin-Cubilin Rezeptorkomplex aufgenommen und durch Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert. Des Weiteren wird auch eine Beteiligung von Fluid-Phase-vermittelter Endozytose diskutiert. Im Anschluss kommt es entweder zu lysosomaler Degradierung oder zur Transzytose des Albumins zurück in den Blutkreislauf (Dickson et al., 2014).

Eine pathologische Proteinausscheidung im Harn kann bis zu 10 g/d betragen und wird in der Regel von einer verringerten Plasmaproteinkonzentration begleitet. Der verminderte onkotische Druck im Plasma trägt zur Entstehung von Ödemen, einer Ansammlung von Flüssigkeit im Interstitium, bei (Schnermann and Sayegh, 1998).

### **1.5. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

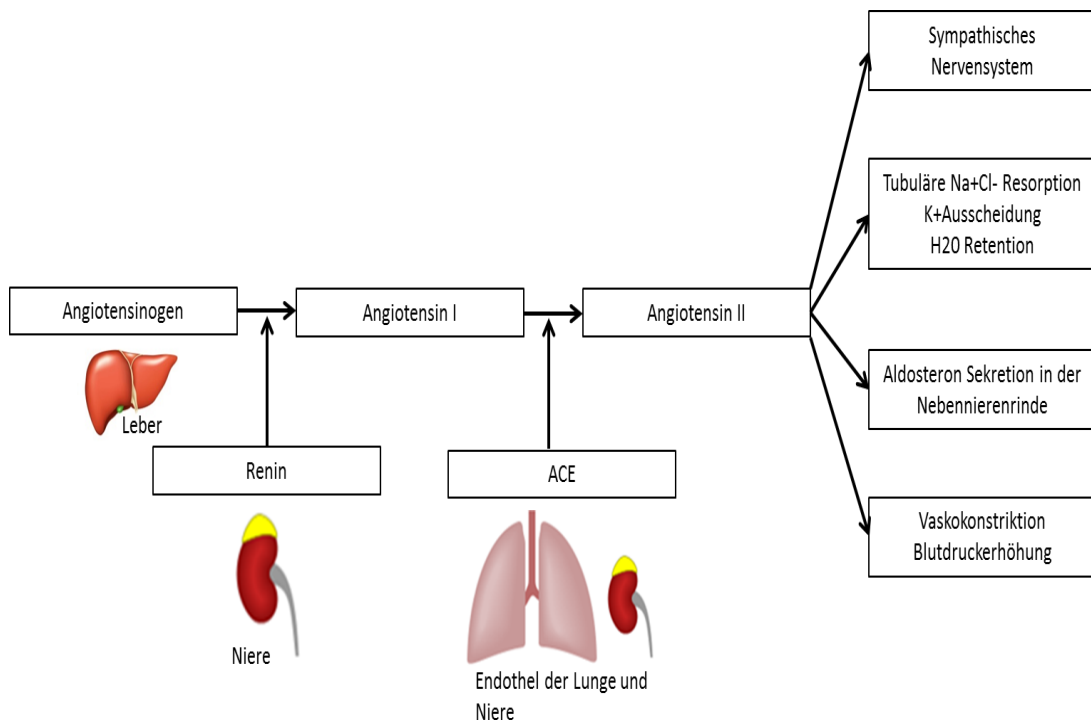
Die Ursachen für die Entstehung einer Proteinurie sind multifaktoriell. Zur Standardtherapie einer Proteinurie gehören Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Ruggenenti et al., 2012), die eine sehr gute Wirksamkeit zeigen.

Folglich kann dem RAAS eine pathologische Bedeutung für die Entwicklung einer Proteinurie zugeschrieben werden. Es erfüllt jedoch auch unter physiologischen Bedingungen wichtige Funktionen. Diese sollen im Anschluss erläutert werden.

Das RAAS ist unter physiologischen Bedingungen an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus beteiligt. Es spielt auch eine entscheidende Rolle im Salz- und Wasserhaushalt und durch Interaktionen mit dem sympathischen Nervensystem und zahlreichen Hormonen ist es an der Regulierung des Herz-Kreislaufsystems beteiligt. Bei einem Blutdruckabfall, einem verringertem intravaskulärem Volumen, einer Hyponatriämie, einer Hypokaliämie sowie Veränderungen im Chloridhaushalt kommt es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Castrop et al., 2010).

Zunächst wird Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriole freigesetzt. Renin spaltet das in der Leber gebildete Angiotensinogen in Angiotensin I. Angiotensin I wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) in Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II stellt das eigentliche Effektorpeptid dar. Es führt zu einer Vasokonstriktion in der Peripherie, Aktivierung des sympathischen Nervensystems und zu einer gesteigerter

Resorption von Natrium, Chlorid und Wasser im Tubulusapparat. Durch vermehrte Ang II-abhängige Aldosteron Sekretion in der Nebennierenrinde wird zudem die Salz- und Wasserrückresorption begünstigt (Pape et al., 2014).



**Abbildung 1: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System** (modifiziert nach Rad, 2006)

Ein lokaler negativer Feedback-Mechanismus reguliert das RAAS. Die Bildung und Sekretion von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen wird durch die Synthese von Angiotensin II gehemmt (Hackenthal et al., 1990, Castrop et al., 2010).

### 1.5.1. Das Effektorpeptid Angiotensin II und seine Rezeptoren

Angiotensin II, als Effektorpeptid des RAAS, spielt eine wichtige Rolle für die kurz- und mittelfristige Blutdruckregulation. Seine Wirkung entfaltet es durch Bindung an G-Protein-gekoppelte AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren, wobei die Affinität zu beiden Rezeptoren gleich stark ausgeprägt ist (Helmy et al., 2009).

Klassische Angiotensin II vermittelte Effekte, wie eine Vasokonstriktion, eine vermehrte tubuläre Salzurückresorption und eine Sekretion von Aldosteron werden durch Stimulation des Angiotensin II-Rezeptor-Subtyp 1 (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) moduliert. In der Niere werden AT<sub>1</sub>-Rezeptoren hauptsächlich im S3-Segment des proximalen Tubulus, im vaskulären System des Nierenkortex und in den Mesangialzellen und Podozyten des Glomerulums exprimiert (Sharma et al.,

1998, Miyata et al., 1999). Sie sind jedoch auch in weiteren Organen, wie zum Beispiel der Nebennierenrinde, dem Herzen, der Leber und dem Gehirn zu finden (Mehta and Griendling, 2007).

Die Regulation der AT<sub>1</sub>-Rezeptor Expression beruht auf einem Ang II-abhängigen Desensibilisierungsmechanismus. Durch die Bindung von Angiotensin II an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor kann es zu einer Internalisierung und folglich zu einer geringeren Expression des Rezeptors kommen (Gunther et al., 1980). Des Weiteren spielen Angiotensin-Rezeptor-assoziierte Proteine eine wichtige Rolle für Modulation der Rezeptorexpression (Castrop, 2013).

Obwohl die klassischen Effekte von Angiotensin II in der Niere vor allem über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt werden, beeinflusst auch die Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors die Nierenfunktion. Dem AT<sub>2</sub>-Rezeptor wird nach Aktivierung eine gegenläufige Wirkung zugeschrieben. Angiotensin II wirkt am AT<sub>2</sub>-Rezeptor vasodilatatorisch (Tsutsumi et al., 1999), natriuretisch (Siragy et al., 1999) und entzündungshemmend (Abdel-Rahman et al., 2008).

Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor wird in der adulten Niere überwiegend in den Podozyten und Mesangialzellen der Glomeruli, in proximalen und distalen Tubuli und in der afferenten Arteriole exprimiert (Sharma et al., 1998, Miyata et al., 1999).

Die Expression des AT<sub>2</sub>-Rezeptors wird durch Behandlung mit einem AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten stimuliert. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die AT<sub>2</sub>-Rezeptor Expression, anders als die AT<sub>1</sub>-Rezeptor Expression, einem positiven Feedback-Mechanismus unterliegt (Jin et al., 2002). Außerdem scheint eine Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors zu einer erhöhten Expression des AT<sub>2</sub>-Rezeptors zu führen (De Paolis et al., 1999).

### **1.5.2. Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems**

Die beiden wichtigsten Substanzklassen zur Hemmung des RAAS stellen die ACE-Hemmer und die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten dar. Ihre renoprotektiven Effekte konnten in zahlreichen Studien verifiziert werden (Currie and Delles, 2013).

ACE-Hemmer (z.B. Enalapril, Captopril, Ramipril) inhibieren die Metalloprotease Angiotensin-konvertierendes-Enzym kompetitiv. Sie blockieren somit die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II. Da die ACE-Hemmer

außerdem für den Abbau der Entzündungsmediatoren Bradykinin und Substanz P verantwortlich sind, kann es unter ACE-Therapie zu Nebenwirkungen wie Reizhusten oder einem angioneurotischen Ödem kommen (Atlas, 2007). In der Regel kommt es bei 7-9% der Patienten zu Reizhusten. Vor allem bei älteren Patienten klagen bis zu 30% über Husten (Hansson et al., 1999). Ein angioneurotisches Ödem ist eine sehr seltene, jedoch lebensbedrohliche unerwünschte Nebenwirkung. Sie tritt mit einer Häufigkeit von 0,1 - 0,2% vorwiegend bei Frauen auf (Müller-Oerlinghausen et al., 1999).

AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Losartan, Valsartan, Candesartan) hemmen nicht wie ACE-Hemmer die Entstehung von Angiotensin II sondern dessen Wirkung am AT<sub>1</sub>-Rezeptor. Die typischen Effekte von Angiotensin II wie die Vasokonstriktion, die Salz- und Wasserretention und die Ausschüttung von Aldosteron, werden über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt. Der Abbau von Bradykinin und Substanz P wird durch AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker nicht beeinflusst. Grundsätzlich weisen AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten aus diesem Grund eine bessere Verträglichkeit im Vergleich zu ACE-Hemmern auf (Müller-Oerlinghausen et al., 1999).

Die pathophysiologischen Effekte von Angiotensin II sind vorrangig AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt (Atlas, 2007). Dem AT<sub>2</sub>-Rezeptor wird nach Aktivierung eine gegenläufige Wirkung zugeschrieben. Angiotensin II wirkt am AT<sub>2</sub>-Rezeptor vasodilatatorisch (Tsutsumi et al., 1999), natriuretisch (Siragy et al., 1999) und entzündungshemmend (Abdel-Rahman et al., 2008).

In präklinischen Studien wird ein protektiver Effekt des AT<sub>2</sub>-Rezeptors für die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion postuliert (Siragy, 2009).

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie eine Behandlung der Tiere mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten Losartan durchgeführt, um dessen Effekte im Goldblatt-Hypertonie-Modell genauer zu untersuchen.

## **2. Pathophysiologie der unilateralen Nierenarterienstenose**

In Deutschland sind 28% der Männer und Frauen von einem Bluthochdruck betroffen (Robert Koch Institut, 2014). Die Nierenarterienstenose (NAST) ist die häufigste Grunderkrankung einer sekundären Hypertonie. Unter einer Nierenarterienstenose versteht man die ein- oder beidseitige Verengung der A. renalis.

Der Grad der Stenose, der nötig ist um hämodynamisch wirksam zu sein, wird je nach Literatur zwischen 50 und 80% angegeben (Radermacher et al., 2001, Simon, 2000). Der Grad der Lumeneinengung beeinflusst deutlich die Durchblutung der stenotischen Niere. Nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz verhält sich der Gefäßwiderstand (R) umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Radius (r). Kommt es zu einer Einengung des Gefäßlumens, so nimmt der Radius ab und der Gefäßwiderstand deutlich zu.

### **2.1. Prävalenz der Nierenarterienstenose**

Bei ca. 5% der Hypertonie-Patienten liegt ursächlich eine Nierenarterienstenose zugrunde (Budde, 2003, Williams, 2003). In den meisten Fällen handelt es sich um eine unilaterale Stenose. Die Häufigkeit einer bilateralen Einengung der Nierenarterie liegt bei 12-22% (Hansen et al., 2002, Missouris et al., 1994, Dorros et al., 1998). Mit zunehmendem Alter steigt die Prävalenz, dass sich eine Nierenarterienstenose klinisch manifestiert. Bei 6% der Patienten, die eine chronische Niereninsuffizienz entwickeln, konnte eine Nierenarterienstenose als Hauptursache nachgewiesen werden (Tamadon and Beladi-Mousavi, 2013, Beladi-Mousavi et al., 2012). Außerdem ist bei 20% der dialysepflichtigen über 50-Jährigen eine NAST ursächlich am Krankheitsverlauf beteiligt (Chrysochou and Kalra, 2010, Payami et al., 2016). Bei den über 65-Jährigen liegt die Prävalenz einer renovaskulären Erkrankung bei 6,8% (Hansen et al., 2002). Risikofaktoren sind das Vorliegen weiterer Krankheitsbilder, wie zum Beispiel koronare Herzkrankheit, Koronarstenosen, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und periphere arterielle Verschlusskrankheit (Park et al., 2004, Sawicki et al., 1991).

### **2.2. Ursachen einer Nierenarterienstenose**

Eine Nierenarterienstenose kann von sehr unterschiedlicher Genese sein. Häufig liegen eine fibromuskuläre Dysplasie oder atherosklerotische Veränderungen zugrunde. Aber auch die Kompression der Nierenarterie durch Tumor, Arteriitis, Aneurysma, Thrombose oder Embolie der Nieren können ursächlich sein (Kuhlmann et al., 2003). In Asien und Indien verursacht die Takayasu Arteriitis bis zu 60% der Nierenarterienstenosen (Cheung et al., 2005). Nach einer Nierentransplantation kann es in seltenen Fällen ebenfalls zu einer Nierenarterienstenose kommen (Polak et al., 2006).

### **2.2.1. Atherosklerotische Nierenarterienstenose**

Die häufigste Ursache einer Nierenarterienstenose sind atherosklerotische Veränderungen, wie sie in 90% der Patienten gefunden werden. Es sind vor allem Männer betroffen (Herold, 2006). Dabei kommt es zu Ablagerungen von Blutfetten, Thromben, Bindegewebe und Calciumphosphat in den Gefäßwänden. Die Läsion ist vor allem im ostialen Bereich und im proximalen Drittel der A. renalis lokalisiert. Meist bleiben die atherosklerotischen Veränderungen jedoch nicht auf die Nierenarterie beschränkt, sondern treten generalisiert auf (Cheung et al., 2005). Mit fortschreitendem Alter steigt das Risiko, an dieser Form der Nierenarterienstenose zu erkranken (Safian and Textor, 2001). Es wurde des Weiteren von einer Progression der Stenose in 51% der Fälle in den ersten fünf Jahren nach der Diagnosestellung berichtet. In 3-16% entwickelt sich ein vollständiger Verschluss der Arterie. Zu einer Atrophie der betroffenen Niere um mehr als 60% kommt es in 21% der Fälle (Caps et al., 1998).

### **2.2.2. Fibromuskuläre Dysplasie**

Unter einer fibromuskulären Dysplasie versteht man eine nicht-entzündliche Proliferation von Bindegewebe und glatter Muskulatur in den arteriellen Wänden. Der häufigste Manifestationsort ist die A. renalis mit 58% der Fälle, wobei die rechte Nierenarterie häufiger betroffen ist (Cheung et al., 2005). Etwa 10% der Nierenarterienstenosen sind auf eine fibromuskuläre Dysplasie zurückzuführen (Safian and Textor, 2001). Es werden drei verschiedene Subtypen der fibromuskulären Dysplasie unterschieden. Die sehr seltene, intimale Form tritt im Alter von 0-25 Jahren auf und betrifft in der Regel das mittlere Drittel der Nierenarterie. Weit häufiger ist die mediale Form, die vor allem im distalen Drittel der A. renalis und in ihren Aufzweigungen zu finden ist. Meist wird diese Form bei Frauen im Alter zwischen 25 und 50 Jahren diagnostiziert. Die Adventitiafibroplasie ist ebenfalls sehr selten und befällt das mittlere und distale Drittel der Nierenarterie. Die betroffenen Patienten sind meist 15-30 Jahre alt. Die intimale und periarterielle Form geht häufig mit einer Dissektion und Thrombose einher, wohingegen die mediale Form in 30% der Fälle eine spontane Progression zeigt, aber nicht zur Dissektion und Thrombosebildung neigt (Safian and Textor, 2001).

Die Ätiologie der Erkrankung ist nicht abschließend geklärt. Eine genetische Prädisposition oder eine embryonale Virusinfektion werden diskutiert. Auch das

Rauchen scheint einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung und/oder den Verlauf zu haben (Plouin et al., 2007).

### 2.3. Klinische Hinweise auf das Vorliegen einer Nierenarterienstenose

Es gibt zahlreiche klinische Symptome, die auf das Vorliegen einer Nierenarterienstenose hinweisen (McLaughlin et al., 2000, Cheung et al., 2005, Safian and Textor, 2001, Herold, 2006).

<b>Hypertonie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• plötzliches Auftreten einer Hypertonie vor dem 50. Lebensjahr (→ fibromuskuläre Dysplasie)</li> <li>• plötzliches Auftreten einer Hypertonie nach dem 50. Lebensjahr (→ atherosklerotische NAST)</li> <li>• rasch progrediente Hypertonie</li> <li>• therapieresistente Hypertonie</li> <li>• fehlende nächtliche Blutdrucksenkung</li> </ul>
<b>Veränderung der renalen Funktion</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nierenfunktionseinschränkung, insbesondere nach Gabe von ACE-Hemmern</li> <li>• Hypokaliämie</li> </ul>
<b>Weitere klinische Anzeichen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• einseitig kleine Niere</li> <li>• abdominales Strömungsgeräusch und/oder Flankengeräusch</li> <li>• schwere hypertensive Retinopathie</li> <li>• Koronare Herzkrankheit</li> <li>• Atherosklerotische Erkrankungen</li> <li>• perivaskuläre Verschlusskrankheit</li> <li>• unerklärbares Herzversagen oder akutes pulmonäres Ödem</li> <li>• bei nierentransplantierten Patienten: Verschlechterung der Hypertonie und Transplantatversagen bei normalem Urinstatus und –sediment</li> </ul>

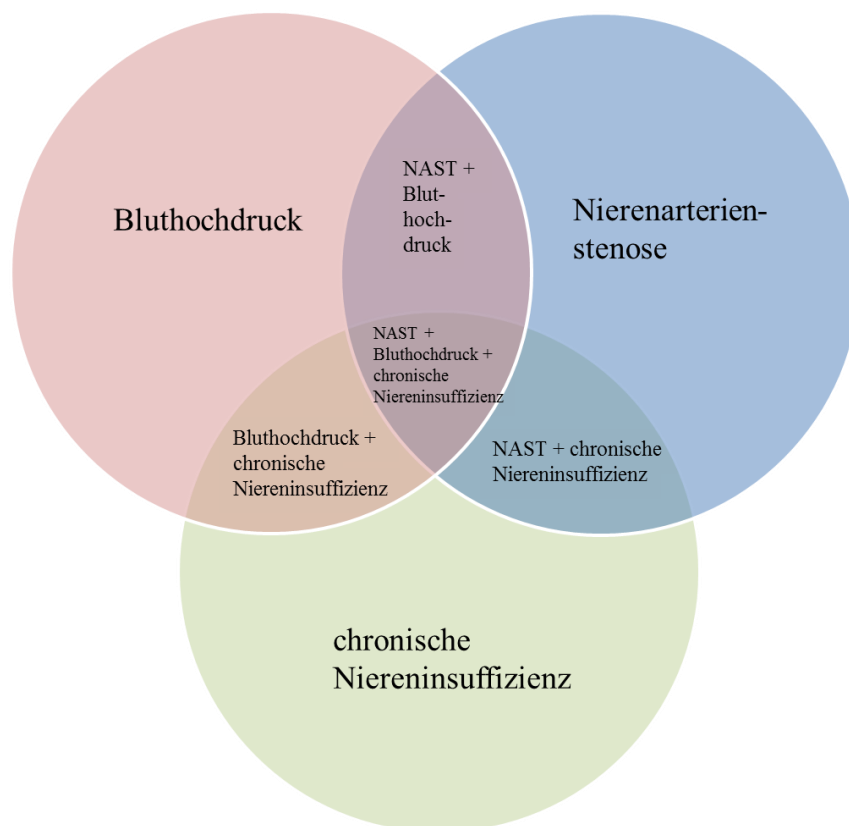
**Tabelle 1: Klinische Hinweise auf eine renovaskuläre Hypertonie** (modifiziert nach (Safian and Textor, 2001))

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die häufigsten Symptome im Zusammenhang mit einer Nierenarterienstenose. Wenn ein oder mehrere der hier genannten Symptome bei einem Patienten vorliegen, bedarf es der weiteren Abklärung, ob eine Nierenarterienstenose vorliegt. Es stehen Suchtests zu Verfügung, deren positives Ergebnis das Vorhandensein einer Nierenarterienstenose wahrscheinlich macht. Bildgebende Verfahren können bei der Diagnosesicherung hilfreich sein. Die Doppler-Sonographie stellt ein nicht-invasives Verfahren dar, das sich gut zur Verlaufskontrolle atherosklerotischer Veränderungen eignet (Caps et al., 1998). Des Weiteren kommen verschiedene Angiographische Verfahren zum Einsatz. Neben der intravenösen digitalen Subtraktionsangiographie, der MRT-

Angiographie (mit Gadolinium) und der Spiral-CT-Angiographie kann eine intraarterielle Angiographie durchgeführt werden. Sie gilt als Goldstandard (Middeke, 2005). Mit Hilfe dieser Methode kann der prä- und poststenotische Blutdruck gemessen werden. Ein transstenotischer Druckgradient von 15 mmHg gilt als hämodynamisch relevant. Da es sich um ein invasives Verfahren handelt, kann es zu Komplikationen wie einer Kontrastmittel-induzierten Nierenfunktionsbeeinträchtigung kommen (Kribben et al., 1998).

### 3. Verlauf und Folgen einer unilateralen Nierenarterienstenose

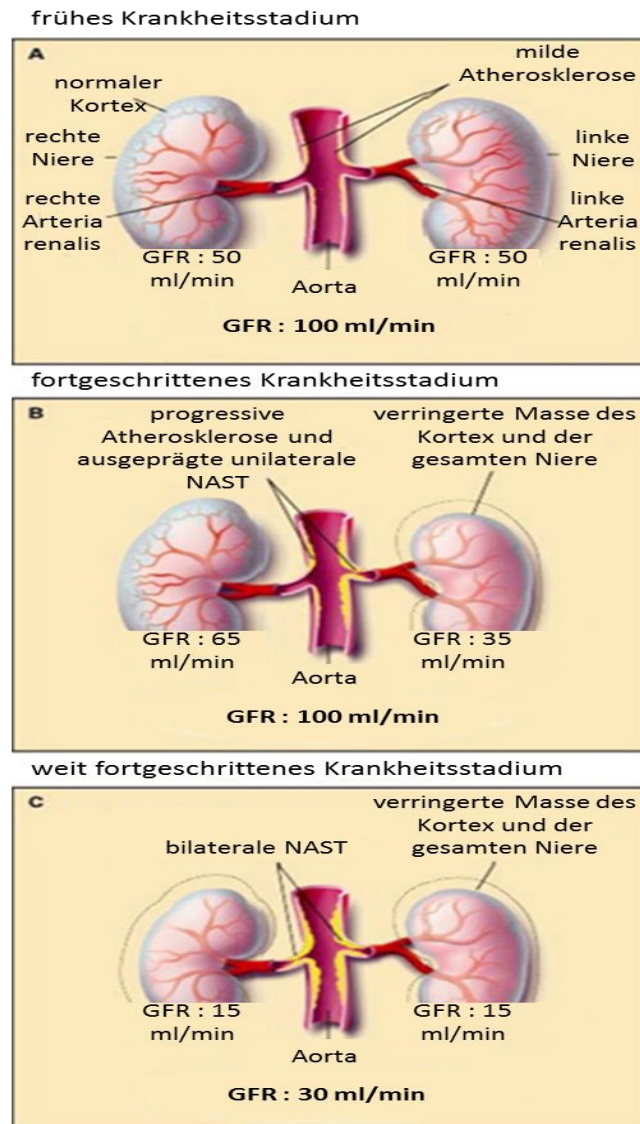
Die häufigsten Folgen einer Nierenarterienstenose für den Organismus sind die Steigerung des arteriellen Blutdrucks und die Einschränkung der Nierenfunktion bis hin zur Niereninsuffizienz und Dialysepflichtigkeit des Patienten. Beide können sich zum Teil gegenseitig bedingen, aber auch isoliert vorkommen (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Zusammenhang zwischen Nierenarterienstenose, Bluthochdruck und Niereninsuffizienz** (modifiziert nach Safian und Textor, 2001)



Am Beispiel einer progressiven Atherosklerose wird im Folgenden der typische Verlauf einer Nierenarterienstenose mit ischämischer Nephropathie erläutert (siehe Abbildung 3). Zu Beginn der Erkrankung finden sich meist nur milde atherosklerotische Veränderungen im perirenal Bereich der Aorta abdominalis, die den renalen Blutfluss und die Kreatininkonzentration im Serum nicht beeinflussen. Die Größe der Nieren, des Nierenkortex und die GFR sind physiologisch. Im weiteren Verlauf entwickelt sich eine erhebliche unilaterale Einengung der Nierenarterie mit der Folge eines reduzierten Blutflusses, der die gesamte Niere und vorrangig den Nierenkortex an Masse verlieren lässt. Die glomeruläre Filtrationsrate kann durch die kompensatorische Funktion der kontralateralen Niere normal oder leicht verringert sein. Schreiten die atherosklerotischen Veränderungen fort, so kann sich eine bilaterale Nierenarterienstenose mit einer erhöhten Serumkreatininkonzentration und einer reduzierten glomerulären Filtrationsrate in beiden Nieren entwickeln (Safian and Textor, 2001).



**Abbildung 3: Progression einer atherosklerotischen Nierenarterienstenose**  
(modifiziert nach Safian und Textor, 2001)

Bereits 1934 wurde jedoch die Hypothese aufgestellt, dass auch bei einseitiger Nierenarterienstenose ein erhöhtes Risiko besteht, einen beidseitigen Nierenfunktionsverlust zu erleiden. Die herabgesetzte Perfusion der stenotischen Niere beeinflusst durch die systemische Blutdruckerhöhung auch indirekt die Funktion der kontralateralen Niere (Goldblatt et al., 1934).

### 3.1. Pathophysiologie der renovaskulären Hypertonie/Goldblatt-Hypertonie

Goldblatt postulierte im Jahr 1934, dass eine minderperfundierte Niere an der Pathogenese einer Hypertonie beteiligt sein kann (Goldblatt et al., 1934). Erste Versuche wurden an Hunden durchgeführt. 1970 wurde auf diesen Grundlagen das Two-Kidney-One-Clip-Modell (2K1C-Modell) in der Ratte etabliert (Miksche

et al., 1970). Dieses Modell wurde genutzt, um den Zusammenhang zwischen einer Nierenarterienstenose, Hypertension und Niereninsuffizienz besser zu verstehen.

Die renovaskuläre Hypertonie, die nach ihrem Entdecker als Goldblatt-Hypertonie benannt wurde, wird zu den sekundären Hypertonieformen gezählt. Bei einer sekundären Hypertonie ist die Grunderkrankung bekannt. Die Diagnose einer Nierenarterienstenose bei Bluthochdruckpatienten ist jedoch nicht beweisend für eine renovaskuläre Genese der Hypertonie. Bei chronischer, essentieller Hypertonie kann es auch sekundär zu einer atherosklerotischen Lumeneinengung der Nierenarterie kommen (Krumme, 2001).

An der Pathophysiologie einer renovaskulären Hypertonie sind vor allem drei Regelkreisläufe beteiligt:

- Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems
- Aktivierung des sympathischen Nervensystems
- Herabgesetzte endotheliale Funktion durch oxidativen Stress

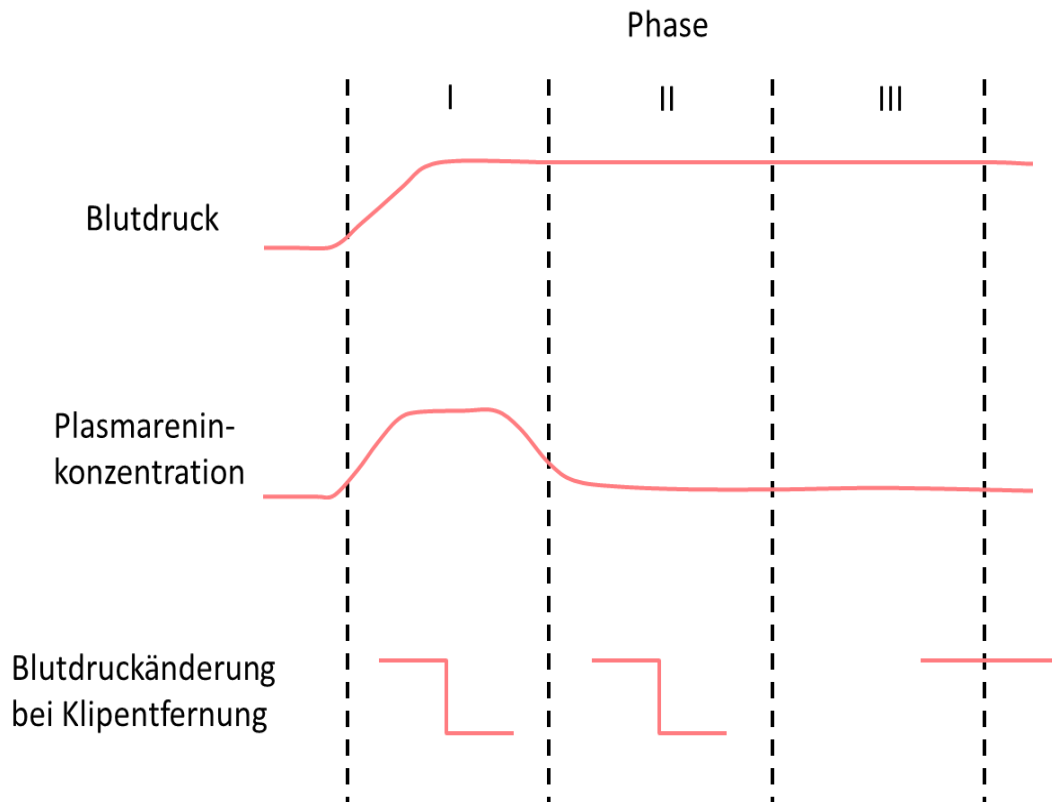
### **3.1.1. Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems**

Eine sehr wichtige Rolle für die Entstehung einer renovaskulären Hypertonie spielt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist unter physiologischen Bedingungen an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus und der Blutdruckregulation beteiligt. Im Falle einer unilateralen Nierenarterienstenose führt eine signifikante Verringerung der Nierendurchblutung, die mit einem Abfall des Perfusionsdrucks einhergeht, zu einer Aktivierung des RAAS (Skeggs et al., 1976).

Über die vermehrte Ausschüttung von Angiotensin II und dessen Wirkung am AT<sub>1</sub>-Rezeptor kommt es zu einer Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion, einer erhöhten tubulären Salzresorption sowie der Ausschüttung von Aldosteron. Diese Effekte führen zu einer Erhöhung des effektiv zirkulierenden Volumens und des Blutdrucks, um die Perfusion der stenotischen Niere aufrechtzuhalten.

In Abhängigkeit von der Aktivierung des RAAS können im experimentellen Modell einer renovaskulären Hypertonie drei Phasen unterschieden werden (siehe Abbildung 4). In der ersten Phase stehen eine Ischämie und eine Aktivierung des

Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems im Vordergrund. In dieser Phase ist die Blutdruckerhöhung Renin- bzw. Ang II-abhängig. Sie ist durch die Entfernung des Stenoseklips und die Behandlung mit Inhibitoren des RAAS reversibel. In der zweiten Phase, die auch als Übergangsphase bezeichnet wird, beginnen die Plasmapreninlevel zu sinken. Abhängig vom jeweiligen Tiermodell dauert diese Phase mehrere Tage bis Wochen. In dieser Phase wird eine vermehrte Salz- und Wasserretention beobachtet. Durch die Ang II- stimulierte Aldosteronsekretion kommt es zu einer gesteigerten Reabsorption von Wasser und Natrium im Sammelrohr. Des Weiteren bewirken erhöhte Ang II-Level ein gesteigertes Durstgefühl, welches zusätzlich zur Expansion des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens beiträgt. In der Übergangsphase wird die durch die stenotische Niere verursachte Volumenexpansion, teilweise durch Drucknatriurese der kontralateralen Niere verschleiert. Auch während der Übergangsphase bleibt der Bluthochdruck durch Entfernung des Klips reversibel. In der dritten Phase, der chronischen Phase, ist eine Normalisierung des Blutdrucks durch Clipentfernung nicht mehr zufriedenstellend möglich (Pohl, 1999). Auch aus der klinischen Praxis ist bekannt, dass eine Therapie nach langer Krankheitsdauer (>5 Jahren) kaum erfolgreich ist. Der Grund hierfür sind schwerwiegende Veränderungen des Gefäßsystems in der kontralateralen Niere durch den chronischen Hypertonus. Aufgrund zunehmender struktureller und funktioneller Veränderungen in der kontralateralen Niere fällt ihre Exkretionsleistung ab und eine extrazelluläre Volumenexpansion kann nicht mehr ausgeglichen werden (Pohl, 1999).



**Abbildung 4: Phasen der Goldblatt-Hypertonie** (modifiziert nach Pohl, 1999)

Bei Patienten mit atherosklerotischen Veränderungen im Bereich der Nierenarterien ist häufig ein progredienter Verlauf zu beobachten. Da die Nieren über eine Flussreserve verfügen, werden erst deutliche Lumeneingengungen für die exkretorische Funktion der Niere hämodynamisch relevant. Die exkretorische Leistung der Nieren bleibt im Anfangsstadium einer Nierenarterienstenose häufig konstant, da bei intakter kontralateraler Niere diese kompensatorisch wirkt (Rammer et al., 2007).

### 3.1.2. Aktivierung des sympathischen Nervensystems

Neben der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sind noch weitere Faktoren an der Entstehung einer arteriellen Hypertonie beteiligt. Eine gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems scheint vor allem in Phase II und III einer experimentellen Hypertonie von Bedeutung zu sein (Johansson et al., 1999). In dieser Studie wurde eine erhöhte Noradrenalin-Spillover-Rate ermittelt. Diese Messmethode nach Esler (Esler et al., 1988) gilt als Goldstandard für die Erfassung der sympathischen Efferenzen zu einem Organsystem. Des Weiteren kommt es bei Patienten mit renovaskulärer Hypertonie zu einer erhöhten muskulären sympathischen Nervenaktivität (Miyajima et al., 1991).

### **3.1.3.      Oxidativer Stress**

Neben den oben genannten Mechanismen spielt vaskulärer oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese des arteriellen Bluthochdrucks (Lerman et al., 2001). Angiotensin II stimuliert die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Es kommt vor allem zu einer vermehrten Freisetzung von Superoxiden durch die Aktivierung membrangebundener NADH- oder NADPH-Oxidasen (Rajagopalan et al., 1996). Die Funktion des Endothels ist entscheidend von der Balance zwischen einem angemessenen Superoxidlevel und der Freisetzung von Stickstoffmonoxid abhängig. Die vermehrte Freisetzung von Sauerstoffradikalen in Kombination mit einer verringerten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) begünstigt die Dysfunktion des Endothels (Drexler and Hornig, 1999, Dijkhorst-Oei et al., 1999, Taddei et al., 1998, Cai and Harrison, 2000). Die Interaktion von ROS setzt die Bioverfügbarkeit von NO herab. Sowohl bei experimentell erzeugtem renovaskulären Hypertonus als auch in humanen Patienten mit dieser Erkrankung kommt es zu Veränderungen in der endothel-abhängigen Vasodilatation (Hegde et al., 1998, Taddei et al., 1993, Rizzoni et al., 1998), da durch die herabgesetzte NO-Aktivität vasopressiv aktive Substanzen wie ANG II und Endothelin (ET-1) dominieren. Als Konsequenz kommt es zu einer herabgesetzten GFR (Higashi et al., 2002).

### **3.2.          Pathophysiologie der ischämischen Nephropathie**

Neben der Entwicklung einer renovaskulären Hypertonie kann eine Nierenarterienstenose ursächlich an der Entstehung einer ischämischen Nephropathie beteiligt sein. Sie wird durch den sukzessiven Rückgang der glomerulären Filtrationsrate und/oder den Verlust von Nierenparenchym durch Einengung oder Verschluss der Nierenarterie definiert (Adamczak and Wiecek, 2012).

Der Begriff der ischämischen Nephropathie ist jedoch irreführend, da der Abfall der Nierenfunktion keine wirkliche Ischämie zur Ursache hat. Die Niere als eines der wichtigsten Organe ist unter physiologischen Bedingungen mit Sauerstoff überversorgt. 10% des Blutflusses wären für die metabolischen Belange der Niere ausreichend (Epstein, 1997). Um zu vermeiden, dass das Krankheitsbild auf eine tatsächliche Unterversorgung mit Sauerstoff zurückgeführt wird, bevorzugen manche Autoren den Begriff der azotämischen Nierenerkrankung (Textor and Wilcox, 2001). Nur in der frühen Phase der Erkrankung scheint eine renale

Hypoxie eine Rolle in der Pathogenese zu spielen (Adamczak and Wiecek, 2012, Warner et al., 2009). In späteren Stadien konnte keine Sauerstoffunterversorgung des Gewebes gemessen werden (Gloviczki et al., 2010).

Unbestritten ist jedoch, dass eine renale Minderperfusion über eine Aktivierung des RAAS zu einer vermehrten Freisetzung von Ang II führt. Ang II erhöht unter anderem die Expression von TGF- $\beta$  und PDGF-B, was eine Akkumulation von extrazellulärer Matrix und Kollagen Typ IV in der perivaskulären Umgebung, im Interstitium und letztendlich in den Glomeruli verursacht (Lerman et al., 2009, Meyrier et al., 1998). Diese Faktoren sind folglich maßgeblich an der Entstehung einer interstitiellen Fibrose beteiligt.

Sehr auffällig bei der makroskopischen Untersuchung ist die reduzierte Nierengröße bei 45% der Patienten (Schreiber et al., 1984). Es ist jedoch nicht geklärt, ob eine herabgesetzte Nierengröße ein geeigneter Indikator für irreversible Parenchymschäden ist. Histologisch werden bei einer ischämischen Nephropathie Tubulusatrophie, Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose nachgewiesen.

Zu Beginn dominieren histologisch tubulo-interstitielle Veränderungen, die durch zelluläre Aktivierung entstehen. Mononukleäre Zellen wandern in das Interstitium ein und Myofibroblasten setzen inflammatorische Mediatoren frei, die zu Entzündungsprozessen führen (Daemen et al., 1999). Apoptose induziert außerdem eine Atrophie der Tubulusstrukturen (Gobe et al., 1990). In dieser frühen Phase, bevor eine Fibrose einsetzt, scheinen die Veränderungen teilweise reversibel zu sein (Meyrier et al., 1998). Erst in weiter fortgeschrittenen Stadien einer ischämischen Nephropathie wird eine deutliche Glomerulosklerose beobachtet (Keddis et al., 2010). Der progrediente Verlust der GFR korreliert außerdem mit dem Schweregrad histologischer Nierenveränderungen. Histologische Untersuchungen können aus diesem Grund hilfreich in der Prognosestellung einer ischämischen Nephropathie sein (Wright et al., 2001).

#### **4. Therapieziele bei unilateraler Nierenarterienstenose**

Die wichtigsten Therapieziele bei Patienten mit einer Nierenarterienstenose sind:

- Behandlung der Hypertonie
- Stabilisierung der Nierenfunktion
- Vermeidung von Endorganschäden an den Nieren, Augen, Gefäßen und dem Herzen
- Verbesserung der kardiovaskulären Mortalität

(Sturm, 2008)

#### **5. Therapieoptionen bei unilateraler Nierenarterienstenose**

Grundsätzlich stehen drei verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung: die medikamentöse, die endovaskuläre und die chirurgische Therapie.

##### **5.1. Medikamentöse Therapie**

Neben einer Veränderung des Lebensstils steht die medikamentöse Behandlung im Vordergrund. Nach der Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie und der European Society of Cardiology (2011) sind Calcium-Kanalblocker, ACE-Hemmer und Angiotensin II-Rezeptorblocker das Mittel der Wahl in der Hypertoniebehandlung bei unilateraler Nierenarterienstenose. In 86-92% der Fälle ist diese Behandlung erfolgreich (Textor, 1990). Des Weiteren kommen Hydralazin und  $\beta$ -Blocker erfolgreich zum Einsatz (European Stroke et al., 2011). Von den meisten Patienten mit einer hämodynamisch wirksamen unilateralen Stenose wird eine Behandlung mit Inhibitoren des RAAS gut toleriert und scheint sich positiv auf den Krankheitsverlauf auszuwirken (Hackam et al., 2008). Dennoch besteht die Gefahr, dass es durch die Blockade des RAAS zu einem Abfall des hydrostatischen Drucks in den Glomeruli kommt, der einen transienten Abfall der GFR nach sich zieht (European Stroke et al., 2011). Bei hochgradiger bilateraler Nierenarterienstenose und beim Vorliegen nur einer funktionsfähigen Einzelniere mit einer Stenose der A. renalis, werden ACE-Hemmer und Angiotensin II-Rezeptorblocker jedoch aus zuvor genannten Gründen nicht empfohlen.

Um ein Fortschreiten atherosklerotischer Veränderungen einzudämmen, ist eine



Behandlung mit Acetylsalicylsäure, cholesterinsenkenden Medikamenten und das Einstellen des Rauchens von essentieller Bedeutung (Safian and Textor, 2001).

## **5.2. Revaskularisierung**

Neben der medikamentösen Therapie gibt es die Möglichkeit einer Revaskularisierung mit chirurgischen oder endovaskulären Methoden.

### **5.2.1. Perkutane transluminale Angioplastie**

Als revaskularisierende endovaskuläre Maßnahme ist die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) als reine Ballonangioplastie oder mit Stenteinlage (PTA/S) etabliert. Mit Hilfe eines Ballonkatheters, der über eine Schleuse bis zur Stenose vorgeschoben wird, erfolgt eine Weitung der Stenose. In Abhängigkeit von Alter und Gesundheitszustand des Patienten, Ätiologie und Lokalisation der Stenose kann zusätzlich die Implantation eines Stents erfolgen.

Ist die Ursache der Stenose eine fibromuskuläre Dysplasie, ist eine konventionelle Angioplastie ohne Stent zu empfehlen. Sie führt in 82-100 % der Patienten zum Erfolg (Martin et al., 1994, Kidney and Deutsch, 1996). In ca. 10% der Fälle kommt es zu einer Restenose (Tegtmeyer et al., 1982, Sos et al., 1984). Liegt eine atherosklerotische Erkrankung zugrunde, ist eine Angioplastie mit Stentimplantation effektiver, da sie das Risiko einer Dissektion und Restenose durch elastisches Recoil verringert. Die primäre Erfolgsrate ist nach konventioneller Angioplastie für nicht-ostiale atherosklerotische Veränderungen deutlich besser (72-82%) als für ostiale atherosklerotische Läsionen (60-62%) (Bonelli et al., 1995, Canzanella et al., 1989).

Nach einer PTA kann es in 3-15% der Fälle zu Komplikationen kommen (Radermacher et al., 2001, Greco and Breyer, 1997). Lokal an der Punktionsstelle können Hämatome und Pseudoaneurysmen entstehen. Obwohl die endovaskuläre Therapie der chirurgischen überlegen ist, kommt es auch hier zu schweren Komplikationen wie Cholesterinembolie, akutem Nierenversagen, Blutungen, Thrombosen, Dissektion der Nierenarterie oder der Arterie, die für den Zugang verwendet wurde (Yu et al., 2014).

### **5.2.2. Chirurgische Revaskularisierung**

Die chirurgische Revaskularisation kommt als Therapieoption nach aktuellem Wissenstand nur beim Vorliegen eines sehr komplexen anatomischen Aufbaus der

Nierenarterie, nach erfolglosem endovaskulären Eingriff oder bei einer zusätzlichen Notwendigkeit einer Operation an der Aorta in Frage. Die aortorenale Bypass-Operation wurde zunehmend von der extraanatomischen Bypass-Technik abgelöst. Die perioperative Mortalitätsrate liegt bei 2,1-6,1%. Als Komplikationen können Myokardinfarkte (2-9% der Patienten), Schlaganfälle (0-3,3%), Blutungen, die chirurgisches Eingreifen erfordern (2-3%), und Cholesterinembolien (1-4,3%) auftreten (Safian and Textor, 2001).

## **6. Therapie der Nierenarterienstenose im Wandel der Zeit**

In den letzten beiden Jahrzehnten kam es zu einem deutlichen Wandel in der Therapie der Nierenarterienstenose. Dies wird anhand einer Studie deutlich, die in den USA durchgeführt wurde (Liang et al., 2013). Sie beleuchtet die verschiedenen Häufigkeiten der Behandlungsweisen in den Jahren 1988 bis 2009. Dabei war zunächst auffällig, dass die Anzahl der chirurgischen Eingriffe über den gesamten Studienverlauf rückläufig war, was einen Trend zu weniger invasiven Behandlungsverfahren zeigt. Zwischen 1988 und 2006 kam es zu einem rapiden Anstieg der durchgeführten perkutanen transluminalen Angioplastien (mit und ohne Stent). Seit 2006 sind die Zahlen der PTA(S) stark rückläufig. Außerdem hat das Durchschnittsalter der Patienten, bei denen eine PTA(S) durchgeführt wird, im Lauf der Zeit zugenommen. Dies spricht für eine Zunahme der medikamentösen Behandlung der Patienten vor einem Eingriff.

In den letzten Jahren konnte in mehreren randomisierten, kontrollierten Studien gezeigt werden, dass die endovaskuläre Therapie keine Vorteile gegenüber einer rein medikamentösen Therapie mit sich bringt.

2009 wurde in der ASTRAL-Studie (Angioplasty and Stenting for Renal Artery Lesions), an der 806 Patienten teilnahmen, gezeigt, dass es keine Unterschiede bezüglich Mortalität, systolischem und diastolischem Blutdruck und Nierenfunktion in Patienten mit medikamentöser oder endovaskulärer Therapie gibt (Investigators et al., 2009). Auch die STAR-Studie (STent placement in patients with Atherosclerotic Renal artery stenosis and impaired renal function: a randomized trial) untersuchte die Sinnhaftigkeit endovaskulärer Eingriffe in der Therapie der Nierenarterienstenose. Es konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede der Nierenfunktion im Vergleich zu einer medikamentösen Therapie gesehen werden (Bax et al., 2009). Kritiker merkten an, dass auch Patienten mit

nicht signifikanter Stenose eingeschlossen wurden (Foy et al., 2012). Außerdem wurde in diesen Studien nicht die klinische Wirksamkeit der Stentimplantation untersucht. Aus diesem Grund wurde die CORAL-Studie (Cardiovascular Outcomes in Renal Atherosclerotic Lesions) durchgeführt. Insgesamt nahmen 947 Patienten mit einer atherosklerotischen Nierenarterienstenose mit einem Schweregrad von  $>60\%$  teil. Es wurden nur Patienten untersucht, die entweder unter einer Hypertonie litten und mit mindestens 2 Antihypertensiva behandelt wurden oder eine chronische Nierenerkrankung aufwiesen. Von besonderem Interesse bei dieser Studie waren klinische Ereignisse im Laufe der Behandlung wie kardiovaskulär oder renal bedingter Tod, Schlaganfall, Herzinfarkt, Herzinsuffizienz oder progressive Niereninsuffizienz. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im primären Endpunkt der beiden Gruppen. Dies gilt auch für die Subgruppe mit einem Stenosegrad von  $>80\%$ . Patienten, die mit Stents versorgt wurden, zeigten zwar geringgradig niedrigere Blutdruckwerte ( $-2,3$  mmHg), diese korrelierten jedoch nicht mit klinischen Ereignissen (Cooper et al., 2014). In der Gruppe der mit Stent behandelten Patienten kam es jedoch bei einigen zu schwerwiegenden Komplikationen.

Folglich konnten auch in dieser Studie keine zusätzlichen positiven Effekte durch Stenting gesehen werden. Die Studienergebnisse zeigen, dass eine medikamentöse Therapie der PTA vorzuziehen ist.

## **7. Aktuelle Therapieempfehlungen**

Aufgrund der aktuellen Studienlage steht eine intensive medikamentöse Behandlung der Patienten im Vordergrund. Der wichtigste Bestandteil der Therapie ist die Behandlung der Hypertonie mit Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.

Eine endovaskuläre Behandlung ist nur bei einem kleinen Anteil der Patienten angezeigt. Bei einem systolischen Blutdruck von mehr als 160 mmHg unter der Behandlung mit mehr als drei Medikamenten und einer schwerwiegenden Stenose von  $>90\%$  scheint sie eine therapeutische Option zu sein (Segrest and Hillegass, 2015). Um dies abzuklären, sind jedoch randomisierte Studien mit Patienten mit schwerwiegenden Stenosen nötig.

## **8. Untersuchung der Funktion und Morphologie des Nephrons im Tiermodell**

In den letzten Jahrzehnten wurden viele Erkenntnisse über die Funktion des Nephrons mit verschiedenen *in vitro* Techniken gewonnen. Bei den klassischen Verfahren an fixiertem Gewebe wie der Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie handelt es sich jedoch immer um Momentaufnahmen, die weitestgehend nur die Struktur zeigen. Funktionelle Interpretationen sind aus histologischen Präparaten nur sehr begrenzt möglich. Es ist folglich keine gleichzeitige Untersuchung der Funktion und der Morphologie möglich. Die Mikropunktion stellt eine *in vivo* Technik dar, die die funktionelle Untersuchung eines Glomerulums erlaubt. Jedoch ist diese Methode sehr invasiv und erlaubt keine simultane Untersuchung der Morphologie. Seit etwa 15 Jahren steht mit der Multiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie ein neues bildgebendes Verfahren zur Verfügung, das die Untersuchung der Nierenfunktion und der Morphologie der Niere und anderer abdominal liegender Organe ermöglicht. Sie stellt eine einzigartige Methode dar, um funktionelle und strukturelle Parameter am lebenden Tier zu untersuchen.

## **9. Einführung in die Multiphotonen-Mikroskopie**

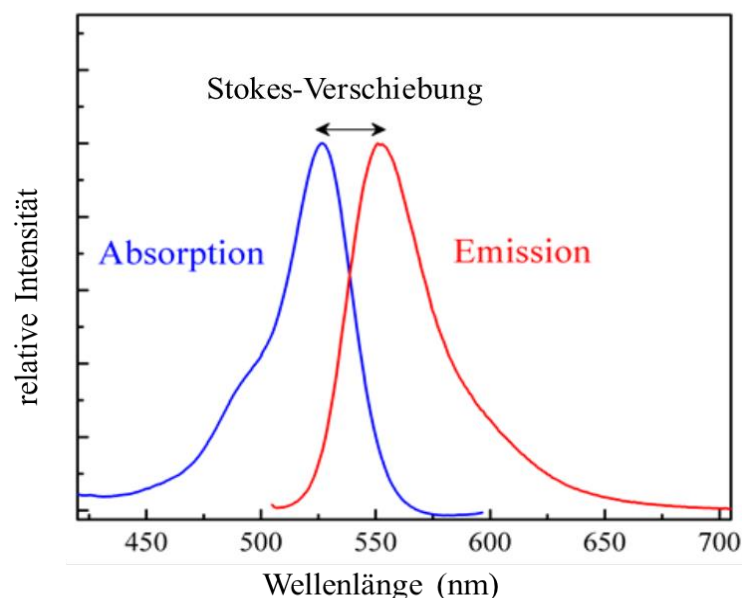
Die deutsch-amerikanische Physikerin Maria Göppert-Mayer legte bereits 1931 durch die Entdeckung der simultanen Absorption zweier Photonen in einem Atom den Grundstein für die Multiphotonen-Mikroskopie (Goeppert-Mayer, 1931). Erst durch die Entwicklung neuer leistungsfähiger Laser, konnte 1961 die erste Zwei-Photonen-Fluoreszenzanregung beobachtet werden (Kaiser and Garrett, 1961).

Bis die Fluoreszenz-Mikroskopie mit Zwei-Photonen-Anregung gelang, sollte es aber bis 1990 dauern (Denk et al., 1990). Einige Jahre später wurde diese Technik erstmalig erfolgreich am lebenden Tier eingesetzt (Dunn et al., 2002, Peti-Peterdi et al., 2002) und hielt von da an Einzug in die biomedizinische Forschung.

Im Folgenden werden das physikalische Prinzip der Multiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie und deren Vorteile gegenüber der konventionellen Mikroskopie erläutert, weil sie die Darstellung tieferliegender Gewebsschichten *in vivo* erlaubt.

### 9.1. Grundlagen der konventionellen Ein-Photonen-Fluoreszenz-Mikroskopie und der konfokalen Mikroskopie

Die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie stellt eine spezielle Art der Lichtmikroskopie dar und beruht auf der Grundlage der Ein-Photonen-Absorption. Der physikalische Effekt der Fluoreszenz entsteht durch Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffs (Fluorophors) mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Das Anregungslicht wird absorbiert und hebt somit ein Elektron des Moleküls aus seinem Grundzustand  $S_0$  auf ein energiereicheres Level  $S_2$ . Die geeignete Anregungswellenlänge ist von der Energiedifferenz zwischen  $S_0$  und  $S_2$  des jeweiligen Moleküls abhängig. Nach Erreichen des  $S_2$ -Zustands geht das Elektron unter Energieverlust aber strahlungsfrei in den  $S_1$ -Zustand über. Die emittierte Fluoreszenz lässt den Übergang vom  $S_1$ -Zustand zurück zum  $S_0$ -Zustand sichtbar werden. Es wird folglich kurzwelligeres Licht absorbiert und Licht von größerer Wellenlänge emittiert. Diese Differenz zwischen den Wellenlängen wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet (siehe Abbildung 5) (Diaspro et al., 2006, Oheim et al., 2006). Die Differenz zwischen absorbiertem und emittiertem Licht beträgt ca. 20-50 nm. Sie macht eine Trennung zwischen dem Anregungslicht und dem Fluoreszenzlicht im Strahlengang des Mikroskops mit Hilfe von speziellen optischen Filtern möglich.



**Abbildung 5: Stokes Verschiebung** (modifiziert nach Sobarwiki, 2013)

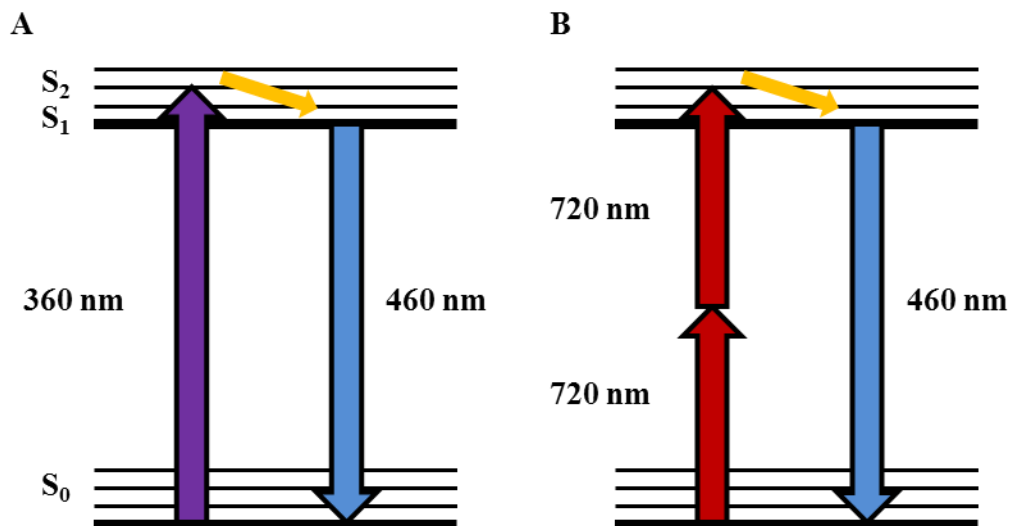
Die Anregung eines Fluorophors erfolgt jedoch nicht nur im Brennpunkt sondern auch in höher und tiefer liegenden Schichten des Präparats, was zu unscharfen

Bereichen durch ein Hintergrundsignal führt. Bei der konfokalen Mikroskopie wurde dieses Problem behoben, indem eine Lochblende vor dem Detektor eingesetzt wird. Mit deren Hilfe gelangt nur ein sehr kleiner Teil des Fluoreszenzlichts der angeregten Probe zum Detektor. Das emittierte Licht wird durch die Lochblende fokussiert, wobei die Mitte der Lochblende und der angeregte Punkt im Präparat konfokal zueinander stehen. Dies ermöglicht die Aufnahme von optischen Schnittbildern mit sehr hohem Kontrast (Oheim et al., 2006).

Am häufigsten kommt dieses Prinzip in konfokalen Laser-Rastermikroskopen zum Einsatz. Dabei wird das Objekt Punkt für Punkt von einem Laser abgetastet und die Probe relativ zum Laserstrahl bewegt. Das emittierte Licht wird auf gleichem Wege über einen Scan-Spiegel zurück gescannt, bevor sich die Position von Laser und Objekt verändern kann. Das emittierte Licht wird nach dem „Zurückscannen“ am Ende des Strahlengangs mit Hilfe sogenannter „Descanned-Detektoren“ aufgezeichnet und ein konfokales Bild entsteht.

## **9.2. Prinzip der Multiphotonen-Mikroskopie**

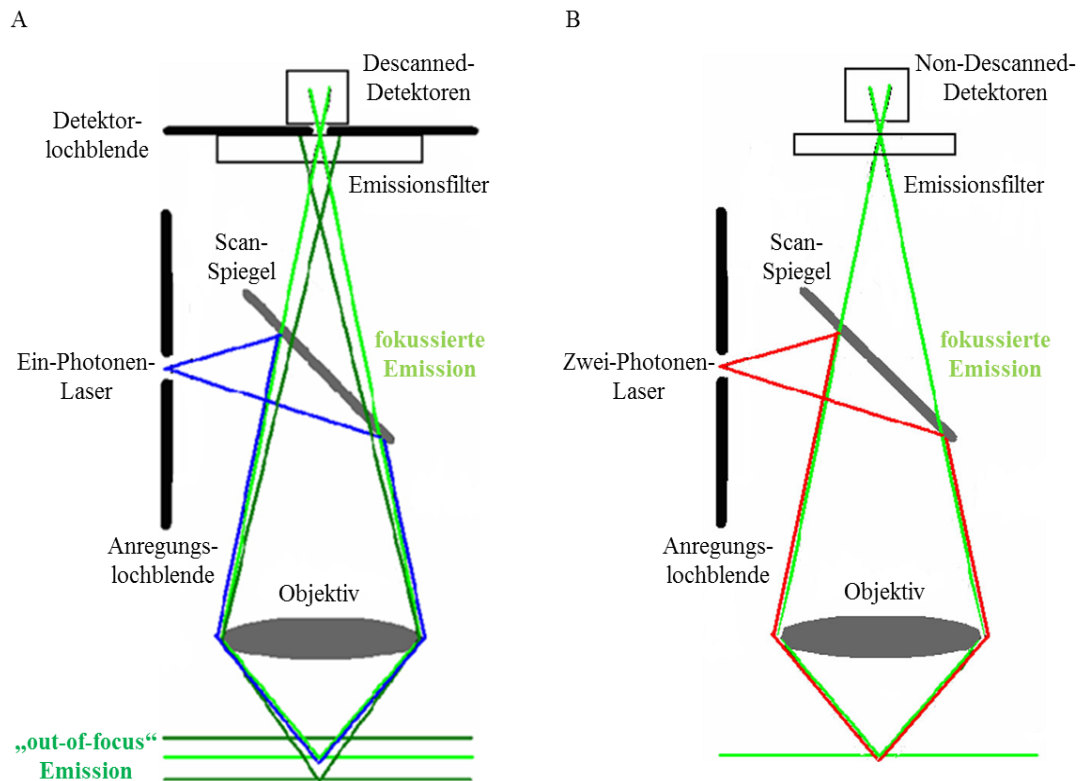
Als Alternative zur konfokalen Mikroskopie hat sich vor allem für *in vivo* Anwendungen die Multiphotonen-Mikroskopie etabliert. Üblicherweise kommt die Zwei-Photonen-Mikroskopie zum Einsatz. Statt durch nur ein Photon wie bei der konventionellen Ein-Photonen-Mikroskopie werden Fluoreszenzfarbstoffe durch zwei Photonen angeregt. Auch eine Anregung durch drei oder mehr Photonen mit entsprechend längeren Wellenlängen ist möglich. Entscheidend ist, dass die Anregungsphotonen in einem Zeitfenster von Attosekunden ( $10^{-18}$  s) auf das Objekt treffen und sich ihre Energie addiert, um eine Anregung zu ermöglichen. Die Anregungswellenlänge ist bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie folglich doppelt so hoch verglichen mit der Ein-Photonen-Mikroskopie (siehe Abbildung 6). Fluoreszenzlicht entsteht erst, wenn das angeregte, energiereiche Photon wieder zurück auf das ursprüngliche Energieniveau fällt (Oheim et al., 2006).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Energieniveaus bei Fluoreszenzanregung (Jablonski-Schema, modifiziert nach Diaspro et al, 2006)** Die Anregung eines bei 460 nm leuchtenden Fluorophors kann mit einem Photon (360nm) (A) oder mit zwei Photonen (720nm) (B) erfolgen. Das erzeugte Emissionslicht ist vergleichbar.

Voraussetzung um ein simultanes Eintreffen zweier Photonen im Fokuspunkt zu erzielen, ist eine sehr hohe Photonendichte von  $10^{20} - 10^{30}$  Photonen/(cm<sup>2</sup>\*s). Um derart hohe Photonenflüsse zu erreichen, die für eine nicht-lineare Anregung nötig sind, wird pulsierendes Licht eingesetzt. Dieses wird üblicherweise durch Titan-Saphir-Laser erzeugt. Sie sind in der Lage sehr kurze (140 fs) und niedrigfrequente (80 MHz) Laserpulse abzugeben (Datenblatt Chameleon Ultra II, Coherent). Zusätzlich wird der Laserstrahl durch die Verwendung eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur fokussiert. Durch die zeitliche und räumliche Fokussierung der Photonen wird die Wahrscheinlichkeit einer Zwei-Photonen-Absorption stark erhöht. Die Anregung unterliegt einer quadratischen Abhängigkeit von der Anzahl der Photonen pro Zeit und Fläche. Die Wahrscheinlichkeit einer Multiphotonen-Absorption nimmt demnach quadratisch mit steigender Distanz zum Fokuspunkt ab (Bianco and Diaspro, 1989). Eine effektive Zwei-Photonen-Anregung eines Fluorophors findet somit in einem sehr begrenzten Volumen von weniger als einem Femtoliter statt (Oheim et al., 2006). Folglich kann auf eine Lochblende verzichtet werden, da das emittierte Licht allein vom Brennpunkt stammt. Da bei der Multiphotonen-Anregung keine Fluoreszenzanregung außerhalb des Brennpunkts stattfindet, wird sie als intrinsisch fokal bezeichnet. Außerdem ist kein Zurückscannen des Beobachtungsstrahlengangs über die Scan-Spiegel, wie in der konventionellen

konfokalen Mikroskopie, nötig (siehe Abbildung 7). Aus diesem Grund können näher an der Probe platzierte, sensitivere „Non-Descanned-Detektoren“ bzw. „Externe Detektoren“ genutzt werden (Diaspro et al., 2006).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des optischen Lichtwegs bei konfokaler (A) und Multiphotonen-Mikroskopie (B)** (modifiziert nach Diaspro et al., 2006) Nach der Passage der Anregungslochblende trifft der Laserstrahl mit Hilfe des Scan-Spiegels auf das Objektiv. Das gebündelte Licht trifft dann auf das Objekt und führt zur Anregung und Emission von Fluoreszenzlicht im Fokuspunkt. Durch den Ein-Photonen-Laserstrahl kommt es auch außerhalb des Brennpunkts zur Anregung eines Fluorophors. Deshalb ist eine Detektorlochblende nötig, um ein scharfes, kontrastreiches Bild zu erzeugen (A). Bei einer Multiphotonen-Anregung ist keine Detektorlochblende nötig, da die MPM intrinsisch fokal ist. Die Detektion des emittierten Lichts erfolgt mittels Descanned- (A) bzw. Non-Descanned-Detektoren (B).

### 9.3. Vorteile der Multiphotonen-Mikroskopie verglichen mit der konventionellen konfokalen Mikroskopie

Obwohl die Multiphotonen-Mikroskopie eine sehr komplexe und kostenintensive Methode zur Untersuchung der Nierenfunktion und -morphologie darstellt, bietet sie zahlreiche Vorteile gegenüber der konfokalen Ein-Photonen-Mikroskopie:

- Im Vergleich zu Ein-Photonen-Anregungsspektren sind Zwei-Photonen-Anregungsspektren breiter und deshalb ist die Anregung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe mit nur einer Lichtquelle möglich.



- Multiphotonen-Anregung der Fluorophore findet nur im Brennpunkt statt. Es ist keine Lochblende und kein Zurückscannen nötig. Aus demselben Grund können sensiblere Detektoren verwendet werden.
- Die Wellenlänge des anregenden Lichts ist verglichen mit der Ein-Photonen-Anregung doppelt so groß. Daraus ergeben sich mehrere Vorteile:
  - Langwelligeres, energieärmeres Licht verursacht weniger Phototoxizität im untersuchten Gewebe.
  - Fluoreszenzfarbstoffe unterliegen einer geringeren Photobleichung.
  - Infrarotes Licht wird weniger absorbiert und gestreut als sichtbares oder ultraviolettes Licht und kann deshalb tiefer in das zu untersuchende Gewebe penetrieren.

(Oheim et al., 2006)

Aufgrund der zahlreichen Vorteile der Zwei-Photonen-Mikroskopie erfreut sich diese Methode zunehmender Beliebtheit. Sie wird vor allem eingesetzt, um funktionelle und morphologische Zusammenhänge *in vivo* zu untersuchen.

## **10. Methodische Vorarbeiten: Generierung eines geeigneten Rattenstamms für die Untersuchung des 2K1C-Modells mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie**

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit stand die Etablierung eines Rattenstamms, der sich einerseits für die Untersuchung mittels Intravitalmikroskopie eignet und andererseits eine normale Nierenfunktion aufweist.

Den limitierenden Faktor der Intravitalmikroskopie stellt die Eindringtiefe des Anregungslasers in das Gewebe dar. Durch den Einsatz der Zwei-Photonen-Anregung ist es möglich geworden, in lebendes Nierengewebe mit dem Anregungslaser bis zu 100 µm tief einzudringen. Dies ist begründet durch die größere Wellenlänge im Vergleich zur Ein-Photonen-Mikroskopie (Helmchen and Denk, 2005). Die meisten Glomeruli sind jedoch tief im Nierenkortex lokalisiert und demnach außerhalb der Reichweite des Laserstrahls. Es ist folglich von

essentieller Wichtigkeit, Tiere mit einer hohen Anzahl oberflächlicher Glomeruli zur Verfügung zu haben, die in der Reichweite des Zwei-Photonen-Laserstrahls liegen. Nur unter dieser Voraussetzung ist eine Untersuchung der glomerulären Funktion möglich.

Die Glomeruli von Mäusen und Ratten sind nur begrenzt für die Untersuchung mittels Intravitalmikroskopie erreichbar. Als geeignete Mauslinien stellten sich BALB/c und BL/6 Mäuse heraus (Schiessl et al., 2013). Aufgrund der großen Anzahl oberflächlicher Glomeruli wurden in den letzten Jahren für die Intravitalmikroskopie vor allem Munich Wistar Frömter (MWF) Ratten eingesetzt. Zur Untersuchung der physiologischen Nierenfunktion sind sie jedoch nur begrenzt geeignet, da sie unter Bluthochdruck und einer progredienten Proteinurie und Glomerulosklerose leiden. Im Besonderen ist außerdem die Albuminausscheidung über den Urin erhöht (Hackbarth et al., 1983, Hackbarth et al., 1991). Die Symptomatik ist in männlichen Ratten stärker ausgeprägt (Remuzzi et al., 1988). Diese Tiere eignen sich im Alter sehr gut als Modell zur Untersuchung der Proteinurie (Schiessl et al., 2015).

Andere Rattenstämme eignen sich nur sehr begrenzt für Multiphotonen-Mikroskopie-Studien, da ihre kortikalen Nierenkörperchen nicht oberflächlich genug lokalisiert sind, um für den Anregungslaser zugänglich zu sein.

Aus diesem Grund wurden weibliche MWF Ratten mit männlichen Wistar Ratten gekreuzt und die F1-Generation der Nachkommen charakterisiert. Besonderes Augenmerk wurde dabei neben dem Blutdruck und der Nierenfunktion auf die Eignung zur Multiphotonenmikroskopie gelegt.

### **III. ZIELSETZUNG**

Bei Patienten, die unter einer unilateralen Nierenarterienstenose leiden, kommt es neben der Entwicklung einer Hypertonie zu hämodynamischen, morphologischen und funktionellen Beeinträchtigungen beider Nieren.

Um diese Veränderungen im Tiermodell mittels Multiphotonen-Mikroskopie nachvollziehen zu können, sollte zunächst ein geeigneter Rattenstamm erzeugt und charakterisiert werden. Zielsetzung war es, durch Kreuzung von MWF und Wistar Ratten einen für die Multiphotonen-Mikroskopie geeigneten Stamm mit normaler Nierenfunktion zu erhalten.

Unter physiologischen Bedingungen ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System maßgeblich an der Aufrechterhaltung des systemischen Blutdrucks und der Nierendurchblutung beteiligt. Da es im zu untersuchenden Goldblatt-Hypertonie-Modell zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems kommt, sollten dessen akute Effekte untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie die intrarenale kapilläre Durchblutung unter dem Einfluss einer unilateralen Nierenarterienstenose seitenvergleichend und im Vergleich zu scheinoperierten Kontrolltieren visualisiert und quantifiziert werden.

Des Weiteren sollten akute Effekte auf die glomeruläre Filtrationsrate, den glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin und damit die glomeruläre Filtration von Albumin untersucht werden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, inwieweit die Albuminrückresorption im proximalen Tubulus in diesem Krankheitsmodell verändert ist. Da die zuvor genannten Faktoren entscheidend an der Entstehung einer Albuminurie beteiligt sind, sollte untersucht werden, inwiefern sie daran beteiligt sind und aus welcher der beiden Nieren letztendlich das im Urin ausgeschiedene Albumin stammt.

Bei der Behandlung einer renovaskulären Hypertonie aufgrund einer unilateralen Nierenarterienstenose werden Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems eingesetzt. Da diese Behandlungsmethode in den letzten Jahren vermehrt favorisiert wird, sollte der Effekt einer Behandlung mit Losartan auf oben genannte Faktoren untersucht werden.

## IV. VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN

### 1. Material

#### 1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Blutdruckmessgerät	Non-Invasive Blood Pressure Monitoring System, TSE Systems, Bad Homburg
Brückenverstärker	F221, AD Instruments, Spechbach
Computer	Precision T1700, Dell, Frankfurt a. Main
Druckmessfühler	MLT844, ADInstruments, Spechbach
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Fluoreszenzlampe	LQ-HXP-120, LEj Leistungselektronik GmbH, Jena
Isofluran-Verdampfer	Harvard Apparatus GmbH, Holliston, MA
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Kühl-und Gefrierschränke	Hera freeze, Thermo electron corporation, Langenselbold  Premium NoFrost, Liebherr, Biberach a.d. Riss
Ratten-OP Tisch, beheizt	08301, KE Med. Techn. Gerätebau, Pfaffing an der Attel
Ratten-Restrainer	Mechanikwerkstatt der Universität Regensburg
Laser	Chameleon Ultra-II Multiphoton-Lasers, Coherent, Santa Clara, USA

Mikroskope	Stereomikroskop 720375, Leica, Wetzlar,  Axio Observer Z1, Zeiss, Jena,  LSM 710, Zeiss, Jena
Narkosegas-Absorber	Harvard Apparatus GmbH, Holliston, MA
NDD -Filter	ZEISS - Reflektormodul 424931, AHF analysentechnik AG, Tübingen
NIC-Kidney	Mannheim Pharma & Diagnostics GmbH, Mannheim
OP-Tisch Beleuchtung	KL 1500 LCD, Schott, Mainz
Osmometer	Osmomat 030, Gonotec, Berlin
Perfusionspumpe	323, Watson Marlow, Falmouth, England
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson Middleton, USA
8-Kanal PowerLab	PowerLab 8/35, AD Instruments, Spechbach
Tail-Cuff System	BP-2000, Visitech System, Apex, NC
Waagen	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen  Küchenwaage
Zentrifuge	Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg

## 1.2. Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Deckgläschen	A.Hartenstein, Würzburg
Glaswaren	Roth, Karlsruhe  Schott, Mainz

Handschuhe	Roth, Karlsruhe
Insulinspritzen	BD Medical, Le pont de Claix Cedex, France
Kalium-EDTA Microvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Nähseide 7-0	Resorba Wundversorgung GmbH, Nürnberg
Nanosep 30 K Centrifugal Devices	Pall Life Sciences, Ann Arbor, USA
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen mit oder ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht  Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Polyethylen-Tubing (0,97 mm)	Harvard Apparatus, Holliston, MA
Polyethylen-Tubing (2mm)	Science Products, Hofheim
Reagiergefäße Eppendorf-Cup (0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Falcon-Tube (15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
VICRYL-Fäden 3-0	Ethicon, Norderstedt

### 1.3. Chemikalien und Pharmazeutika

Produkt	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma Aldrich, Mannheim
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt

FITC-Albumin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FITC-Sinistrin	Fresenius Kabi, Österreich
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Heparin (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim
HCl	Merck, Darmstadt
Isofluran	Baxter, Höchststadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
Leukosilk	BSN medical GmbH, Hamburg
Losartan Potassium	Sigma Aldrich, Mannheim
Lucifer Yellow	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Netzschlauchverband, Größe 2	MaiMed GmbH, Neuenkirchen
Paraffin	Leica, Wetzlar
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

## **2. Methodische Vorarbeiten: Generierung eines geeigneten Rattenstamms für die Untersuchung des 2K1C-Modells mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie**

Um einen geeigneten Rattenstamm zu erhalten, der im Vergleich zu MWF-Ratten ähnlich gut für die Multiphotonen-Mikroskopie geeignet ist, aber dennoch eine normale Nierenfunktion zeigt, wurden MWF Ratten mit Wistar Ratten gekreuzt. Wichtige renale Parameter wurden in der F1-Generation der Kreuzungstiere (MWF/W) untersucht. Alle im Folgenden beschriebenen Eigenschaften wurden in weiblichen und männlichen MWF, Wistar und MWF/W Ratten (n=6) analysiert.

### **2.1. Körpergewichtsentwicklung**

Um den Wachstumsverlauf der MWF/W Ratten zu dokumentieren und mit MWF bzw. Wistar Ratten vergleichen zu können, wurde das Körpergewicht zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Das Gewicht der Tiere wurde im Alter von 6, 10, 14 und 26 Wochen dokumentiert.

### **2.2. Blutdruckmessung**

Die Blutdruckmessung der Ratten erfolgte analog zur Blutdruckmessung nach der Riva-Rocci Methode beim Menschen mit der nicht- invasiven Tail-Cuff Methode. Vor der ersten Messung wurden die Tiere an vier aufeinanderfolgenden Tagen an die experimentelle Prozedur gewöhnt. Am fünften Tag wurde die eigentliche Blutdruckmessung durchgeführt. Für die Messung wurden die Tiere in einem Restrainter fixiert und zunächst bei 37°C in der Messkammer aufgewärmt, um eine Dilatation der Schwanzgefäße zu erzielen. Direkt an der Schwanzwurzel wurde die Druckmanschette mit dahinterliegendem Drucksensor angebracht. Computergestützt wurde der Blutdruck anhand von fünf Einzelmessungen bestimmt und daraus pro Versuchstier ein Mittelwert gebildet.

### **2.3. GFR Bestimmung mittels transkutaner Messung**

Die Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) an wachen Ratten erfolgte mit einer nicht-invasiven transkutanen Messmethode. Die Plasma-Clearance-Messung von exogenen Markern, wie von FITC-Inulin und FITC-Sinistrin gilt dabei als Goldstandard.

Das NIC-Kidney Device (NIC: non-invasiv clearance) der Firma Mannheim Pharma & Diagnostics, welches zur Clearancebestimmung nötig ist, besteht aus



zwei Licht emittierenden Dioden mit einem Emissionsmaximum bei 470 nm für FITC-Sinistrin. Eine eingebaute Photodiode detektiert das Fluoreszenzlicht bei 525 nm. Nach Verstärkung und Digitalisierung des Signals wird es in einem internen Speicher des Mikrokontrollers abgelegt und kann nach Beendigung der Aufzeichnung (zwei Stunden) mit einer USB-Verbindung auf den PC übertragen werden.

Vor der Messung wurde bei den Ratten unter kurzer Isoflurannarkose (2,5 Vol%) ein ca. 5x5 cm großer Bereich am Rücken enthaart. Hierfür wurde ein elektrischer Rasierer und Enthaarungscreme verwendet. Um am Tag der Messung die Aufnahme von Narkosegas zu minimieren, erfolgte dies einen Tag vor der Messung.

Für die eigentliche Messung war eine kurze Allgemeinnarkose mit 2,5 Vol% Isofluran nötig, während der das Tier auf einem beheizbaren Operationstisch gelagert wurde. Das mit einer Batterie verbundene Messelement wurde auf einem selbstklebenden Pflaster mit einer Aussparung für die Dioden aufgebracht. Anschließend wurde es auf der rasierten Hautstelle festgeklebt. Um ein Abrutschen zu verhindern, sichert man das NIC-Kidney Device mit einem Schlauchverband und Leukosilk Tape.

Nach einer dreiminütigen Aufzeichnung des Hintergrundsignals der Haut wurde FITC-Sinistrin (5 mg/kg KGW) in die Schwanzvene injiziert. Für die Clearance-Messung konnte das Tier zurück in einen Käfig verbracht werden und hatte freien Zugang zu Futter und Wasser. Nach 120 min wurde das NIC-Kidney entfernt und die Kurve ausgelesen. Unter Anwendung des One-Compartment-Modells wurde die Halbwertszeit für die Exkretion von FITC-Sinistrin bestimmt. Die semiempirische Umwandlung der Halbwertszeit in die glomeruläre Filtrationsrate erfolgte mit folgender Formel für Ratten:

$$\text{GFR} \left( \frac{\text{ml}}{\text{min}} \frac{\text{kg}}{100\text{g}} \right) = \frac{31,26 \left( \frac{\text{ml}}{100\text{g}} \text{kg} \right)}{t_{\frac{1}{2}} (\text{min})}$$

(Schock-Kusch et al., 2011)

#### **2.4. Albuminausscheidung über den Urin**

Um eine Aussage über das Vorliegen einer Albuminurie bei den drei zu untersuchenden Rattenstämmen zu machen, wurde die Ausscheidung von

Albumin in spontan abgesetztem Urin untersucht. Mittels Gefrierpunkts-erniedrigung konnte zunächst die Urinosmolalität bestimmt werden. Anschließend wurde eine Verdünnung der Proben (1:1,75) hergestellt. Die Proben wurden zusammen mit einem Albumin BSA-Standard (0,25/0,5/1,0/1,5/2,0 µg/ml) auf ein 10%-iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Um eine Quantifizierung des Albumingehalts möglich zu machen, wurde das Gel mit Coomassie angefärbt. Die densitometrische Analyse erfolgte mit Image J 1.4.7. Die Ergebnisse für den Albumingehalt wurden gegen die ermittelte Urinosmolalität normalisiert und als Albumin-Osmolalitäts-Quotient ausgedrückt.

## 2.5. Glomerulosklerose-Index

Im Alter von 6 Monaten wurden die Versuchstiere mit 100 ml einer 3%-igen Paraformaldehydlösung (gelöst in PBS, pH=7,4) über die Aorta abdominalis perfundiert und beide Nieren entnommen. Aus den Paraffin fixierten Nieren wurden Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und eine PAS-Färbung durchgeführt. Mit Hilfe des Glomerulosklerose-Index wurde das Ausmaß der glomerulären Schädigung durch mesangiale Expansion semiquantitativ analysiert. Pro Schnitt wurden 50 Glomeruli nach der Methode von el Nahas (el Nahas et al., 1991) beurteilt, wobei eine Einteilung in 4 Stadien stattfand (siehe Tabelle 2). Die Klassifikation erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher, wobei jeweils die Gruppenzugehörigkeit der Ratten nicht bekannt war.

Stadium	Histologische Veränderungen	Anteil der Veränderungen an der Konvolutfläche
0	Normales Glomerulum	0%
1	Mesangiale Verdickung mit und ohne Proliferation der Mesangiumzellen, keine Beteiligung der Kapillaren	≤ 25%
2	Mesangiale Proliferation mit partieller Gefäßwandbeteiligung, segmentale Sklerose	≤ 50%

3	Große Teile der Kapillaren sind durch mesangiale Proliferation oder Narbenbildung obliteriert, diffuse Sklerose	$\leq 75\%$
4	Totale Obliteration der Kapillaren mit oder ohne Kapillarthrombose, diffuse Sklerose mit Kapillarkollaps	$\leq 100\%$

**Tabelle 2: Glomerulosklerose-Index****2.6. Tiefe der Glomeruli unter der Nierenkapsel**

Aus den Paraffin fixierten Nieren wurden Schnitte mit einer Dicke von 5  $\mu\text{m}$  angefertigt und mit Hematoxylin und Eosin (H&E) angefärbt. Die Tiefe der Glomeruli unter der Nierenkapsel wurde mit Zen 2012 blue edition bestimmt, wobei der geringste Abstand zwischen der Nierenkapsel und dem jeweiligen Glomerulum ausgemessen wurde. Zur weiteren statistischen Auswertung wurden nur die 30 oberflächlichsten Glomeruli pro Nierenschnitt herangezogen. Die statistische Analyse wurde mit Graph Pad Prism 5 unter Anwendung eines einseitigen ANOVA-Tests durchgeführt. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden Aufnahmen mit Hilfe des Multiphotonenmikroskops von oberflächlichen Glomeruli aller drei Stämme angefertigt. Alexa 594-BSA wurde verwendet, um die Kapillarschlingen der Glomeruli sichtbar zu machen. Es wurden 1,3  $\mu\text{l/g}$  KGW einer 5 mg/ml Lösung i.v. injiziert. Zur Aufnahme von z-Stapeln mit 512x512 Pixel wurde die Laserpower mit zunehmender Eindringtiefe ins Gewebe angepasst (7-17%).

**3. Experimentelle Erzeugung einer Nierenarterienstenose**

Zur Erzeugung einer experimentellen unilateralen Nierenarterienstenose (2K1C-Modell) wird das Lumen der A. renalis um ca. 80% eingeengt, um eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zu induzieren. Dafür hat sich bei Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 150 g die Implantation eines Silberklips mit einem Innendurchmesser von 0,19 mm bewährt. Bei allen Versuchstieren handelte es sich um MWF/W Ratten, da sie sich auf Grund ihrer Eigenschaften, die unter IV.1. im Detail erklärt sind, besonders zur Untersuchung mittels Multiphotonen-Mikroskopie eignen.

### **3.1. Chirurgische Implantation eines Stenoseklips**

Die Tiere wurden dafür mit Isofluran (2,5 Vol%) anästhesiert und auf einem beheizbaren Operationstisch auf der rechten Körperseite liegend gelagert. Die linke Flanke wurde mit Hilfe eines elektrischen Rasierers enthaart, anschließend gereinigt und desinfiziert. Nach Abdeckung des Operationsfeldes mit einem sterilen OP-Tuch wurde eine kleine Inzision in der linken Flanke gesetzt und die Niere durch diese vorgelagert. Die A. renalis wurde von der V. renalis und dem umgebenden Gewebe separiert und der Durchmesser der Arterie mit einem U-förmigen Silberklip (Innendurchmesser 0,19 mm) eingeengt. Die Flankeninzision wurde mit einem resorbierbaren Faden (Vicryl USP 3.0) mit Einzelheften verschlossen. Als Analgetikum diente Buprenorphin in einer Konzentration von 0,03 mg/kg KGW (s.c).

Dasselbe Operationsverfahren wurde in den scheinoperierten Kontrolltieren durchgeführt, aber kein Klip auf die Arterie gesetzt.

### **3.2. Blutdruckmessungen**

Die Blutdruckmessung erfolgte für diesen Versuchsabschnitt wie in III.2.2. beschrieben. Vor der ersten Messung wurden die Tiere wieder an die experimentelle Prozedur an vier aufeinanderfolgenden Tagen gewöhnt. Am fünften Tag wurde die eigentliche Basalmessung durchgeführt. Nach der operativen Implantation des Stenoseklips wurde an den darauffolgenden Tagen der Blutdruck bestimmt. Es wurden pro Tag wieder fünf Einzelmessungen aufgezeichnet und daraus pro Versuchstier ein Mittelwert gebildet. Ab einem Blutdruckanstieg  $>20$  mmHg im Vergleich zur Basalmessung wurden die Ratten als hyperten eingestuft. Dies war in der Regel nach ein bis drei Tagen nach der Stenose-OP der Fall.

## **4. Seitenvergleichende Untersuchung der Nierenfunktion bei unilateraler Nierenarterienstenose**

Im Folgenden sollen die Multiphotonen-mikroskopischen Methoden erklärt werden, die eingesetzt wurden, um die hämodynamischen und funktionellen Nierenveränderungen zu visualisieren, die bei einer einseitigen Nierenarterienstenose entstehen.

#### **4.1. Chirurgische Vorbereitung des Versuchstiers**

Die chirurgische Vorbereitung der Ratten erfolgte unter Isoflurannarkose (2,5 Vol%). Die Anästhesie wurde während der anschließenden Messung aufrechterhalten. Das Versuchstier wurde in Rückenlage auf einem beheizbaren Operationstisch in überstreckter Kopf-Hals-Position fixiert. Mit Hilfe einer Rektalsonde konnte die Körpertemperatur konstant bei 37 °C gehalten werden. Zunächst wurde die Haut ventral vom Larynx bis zur Thoraxapertur eröffnet und die linke A. carotis freipräpariert. Die Katheterisierung der Arterie mit einem heparinisiertem Polyethylen-Tubing ermöglichte die Weiterleitung des Signals zum Druckmessfühler. Dieses Signal wurde durch einen Brückenverstärker amplifiziert und mit Hilfe von Lab Chart 7 protokolliert. Auf diese Weise war eine Überwachung des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz während der Messungen möglich. Durch Katheterisierung der V. jugularis mit zwei Polyethylen-Tubings konnten Fluoreszenzfarbstoffe intravenös verabreicht werden. Um die Operationswunde vor Austrocknung zu schützen, wurde sie mit feuchter Gaze abgedeckt. Anschließend wurde die Versuchsratte auf die linke Seite gelegt, ein ca. 2 cm langer Hautschnitt kaudal des Rippenbogens gesetzt und das Peritoneum über der Niere eröffnet. So konnte die Niere extraabdominal vorgelagert und für das Imaging am Multiphotonen-Mikroskop zugänglich gemacht werden. Dieselbe Präparation wurde auch an der rechten Niere durchgeführt. Beide Nieren wurden für den Transport zum Mikroskop mit feuchten Gaze Tupfern abgedeckt.

#### **4.2. Voraussetzungen des Multiphotonen-Mikroskops zur Nierenfunktionsmessung am narkotisierten Tier**

Um die physiologische Körpertemperatur der Ratte während des Versuches aufrechtzuerhalten, ist der Mikroskoptisch des LSM 710 mit einem beheizbaren Einsatz ausgestattet. Im Zentrum des Objektstischs befindet sich ein Deckglas, das mit 0,9%-iger Kochsalzlösung benetzt wurde, sodass die zu untersuchende Niere vor Austrocknung geschützt ist.

Die Anregung der intravenös injizierten Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte mit einem Chameleon Ultra-II Multiphotonen-Laser (Coherent) bei einer Wellenlänge von 800 nm. Als Objektiv wurde ein 40x Wasserobjektiv mit einem großen Arbeitsabstand und einer adäquaten numerischen Apertur eingesetzt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde mit Hilfe externer Detektoren registriert. Sie waren

mit einem Bandpassfilter bei 500-550 nm (grüner Kanal) und einem Bandpassfilter bei 592,5-667,5 nm (roter Kanal) ausgestattet.

#### **4.3. Visualisierung der Nierenstruktur und -funktion mittels Multiphotonen-Mikroskopie**

Für die Visualisierung der Nierenstruktur wurde das Versuchstier mit der jeweils zu untersuchenden Niere auf dem Mikroskoptisch platziert. Alle im Folgenden beschriebenen Parameter wurden in der linken (stenotischen) und in der rechten (kontralateralen) Niere gleichermaßen bestimmt. In den Kontrolltieren ohne Silberklip wurde analog vorgegangen. Außerdem erfolgte die Aufzeichnung des Blutdrucks und der Herzfrequenz über die gesamte Dauer des Versuchs.

#### **4.4. Messung der kapillären Flussgeschwindigkeit und des Blutflusses**

Um das Ausmaß der hämodynamischen Veränderungen in beiden Nieren bei unilateraler Nierenarterienstenose zu charakterisieren, wurden die Blutflussgeschwindigkeit und der Blutfluss in glomerulären und peritubulären Kapillaren gemessen. Durch eine intravenöse Injektion von FITC-Albumin (0,04 mg/g KGW) wurden die Blutgefäße sichtbar gemacht. Die Erythrozyten werden nicht von dem Farbstoff angefärbt und erscheinen deshalb schwarz.

##### **4.4.1. Bestimmung der Flussgeschwindigkeit und des Blutflusses in den peritubulären Kapillaren**

Bei jedem Versuchstier wurden pro Niere jeweils fünf peritubuläre Kapillaren für die Messung ausgewählt. Zunächst wurde eine Strecke mit ca. 15 µm Länge in einer Kapillare markiert, von der im Anschluss eine Zeitserie mit 500 Zyklen aufgenommen wurde. Dies wird als line scan bezeichnet. Für die Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeit wurde der von einem Erythrozyten zurückgelegte Weg und die dafür benötigte Zeit mit Zen 2010 black edition gemessen. Auf einem Z-Stapel, der die gesamte Kapillare abbildete, konnte deren Radius ermittelt und anschließend der Blutfluss quantifiziert werden. Die Blutflussgeschwindigkeit wird berechnet aus der Strecke, die ein Erythrozyt in einer bestimmten Zeit zurückgelegt hat:

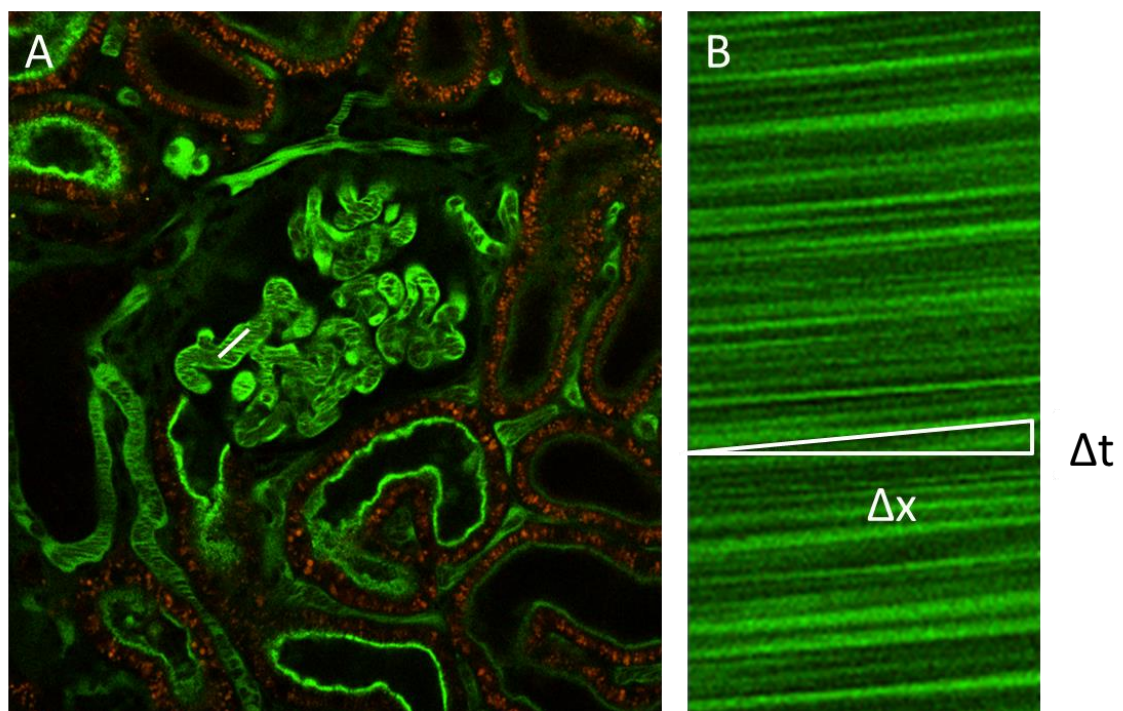
$$\text{Blutflussgeschwindigkeit } \left( \frac{\mu\text{m}}{\text{ms}} \right) = \frac{\Delta x}{\Delta t}$$

Der Blutfluss errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Blutfluss} \left( \frac{\text{nl}}{\text{min}} \right) = \frac{\left( r^2 \times \pi \times \frac{\Delta x}{\Delta t} \right)}{1000 \times 60}$$

#### 4.4.2. Ermittlung der Flussgeschwindigkeit und des Blutflusses in den glomerulären Kapillaren

Pro Versuchstier wurden pro Niere jeweils drei oberflächliche Glomeruli mit jeweils drei Kapillaren ausgesucht und ein line scan aufgezeichnet. Außerdem wurde ein Z-Stapel aufgenommen, um im Anschluss den Radius der glomerulären Kapillaren zu bestimmen (siehe Abbildung 8). Die Berechnung erfolgte analog zu II.4.4.1.



**Abbildung 8: Messung der Blutflussgeschwindigkeit** In der Übersichtsaufnahme eines Glomerulums (A) wurde die zu messende Strecke in einer Kapillare markiert (weiße Linie) und im Anschluss ein line scan aufgezeichnet. Anhand der zurückgelegten Wegstrecke eines Erythrozyten ( $\Delta x$ ) und der benötigten Zeit ( $\Delta t$ ) wurde die Flussgeschwindigkeit errechnet.

#### 4.4.3. Messeinstellungen für die Flussgeschwindigkeits- und Flussbestimmung

Für die Aufzeichnung der ca. 30  $\mu\text{m}$  umfassenden Z-Stapel wurde eine Laserpower von 6-12% eingesetzt. Die Laserpower wurde automatisch mit zunehmender Eindringtiefe ins Gewebe angepasst. Die Bildgröße betrug 512x512

Pixel.

Für die Quantifizierung der Blutflussgeschwindigkeit wurde eine Strecke von ca. 10 µm in glomerulären Kapillaren bzw. 15 µm in peritubulären Kapillaren markiert. Pro Messung wurde eine line scan mit 500 Zyklen aufgezeichnet. Die Bildgröße lag bei 104 Pixeln mit einer pixel dwell time von 1,97 µs.

#### **4.5. Messung der glomerulären Filtrationsrate des Einzelnephrons (Einzelnephron-GFR)**

Die Einzelnephron-GFR ist das Gesamtvolumen des Primärharns, das von einem einzigen Glomerulum innerhalb einer definierten Zeiteinheit filtriert wird. Sie wird in nl/min gemessen.

##### **4.5.1. Bestimmung der Einzelnephron-GFR im Seitenvergleich**

In jedem Versuchstier wurden drei oberflächliche Glomeruli pro Niere ausgewählt, bei denen ein mindestens 150 µm langer Anfangsteil des proximalen Tubulus dargestellt werden konnte. Die Blutgefäße wurden durch Injektion von FITC-Albumin (0,04 mg/g KGW) angefärbt. Es wurde ein Z-Stapel des Glomerulums aufgezeichnet, der den Anfangsabschnitt des proximalen Tubulus umfassend abbildete, um dessen Volumen der ersten 150 µm folgendermaßen zu berechnen:

$$\text{Volumen (nl)} = \text{Länge} \times r^2 \times \pi$$

Im Anschluss wurde ein Bolus von 20 µl einer 5 mg/ml Lucifer Yellow Lösung (LY) intravenös injiziert. Dies wurde in einer Zeitserie aufgezeichnet. LY ist eine 0,5 kD kleines fluoreszierendes Molekül, das frei filtriert wird und anschließend den proximalen Tubulus durchläuft. Zur Bestimmung der Passagegeschwindigkeit wurden zwei Messregionen festgelegt. Die erste Messregion unmittelbar am Beginn des proximalen Tubulus und die Zweite 150 µm weiter distal. Die Fluoreszenzintensität des LY wird in beiden Messregionen im grünen Kanal gemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Durch die Bestimmung der Zeitdifferenz  $\Delta t$  konnte später die Einzelnephron-GFR folgendermaßen ermittelt werden:

$$\text{Einzelnephron - GFR} = \frac{\text{Volumen (nl)}}{\Delta t \text{ (s)}}$$



#### **4.5.2. Messeinstellungen für die Bestimmung der Einzelnephron-GFR**

Zunächst wurde ein Z-Stapel des zu untersuchenden Glomerulums, wie es unter III.4.3.3. beschrieben wurde, aufgenommen. Für die Aufzeichnung der Bolusinjektion von LY in einer Zeitserie war eine große Bildanzahl pro Zeiteinheit nötig. Deshalb wurde nur eine Bildgröße von 100x100 Pixel erfasst. Eine Laserpower von 6% war ausreichend und die Scangeschwindigkeit war maximal.

#### **4.6. Bestimmung des glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin ( $GSC_A$ )**

Der glomeruläre Siebkoeffizient gilt als ein Maß für die Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere. Er ist definiert als die Konzentration einer gegebenen Substanz im Harnraum dividiert durch die Konzentration dieser Substanz in den glomerulären Kapillaren (Deen, 2004). Die Ratio der Fluoreszenzintensitäten eines an Albumin konjugierten Farbstoffes (FITC-Albumin) im Harnraum sowie in den glomerulären Kapillaren steht also für den Siebkoeffizienten von Albumin. Die Fluoreszenzintensitäten von FITC-Albumin konnten mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie bestimmt werden.

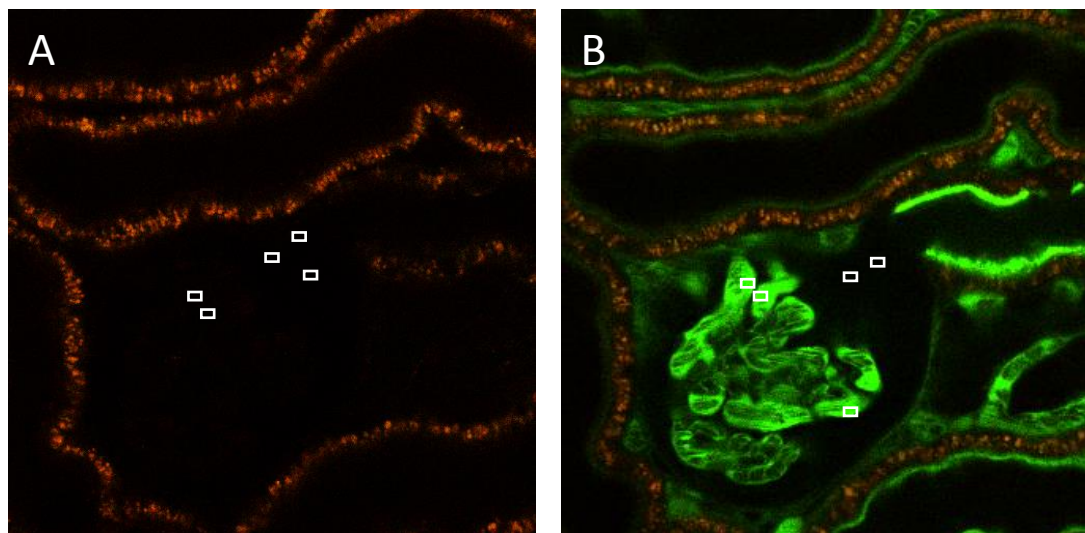
##### **4.6.1. Messung des $GSC_A$ mittels Multiphotonen-Mikroskopie**

Zunächst wurden pro Versuchstier pro Niere drei Glomeruli mit eindeutig erkennbarem Harnraum unter der HXP-Lampe identifiziert und Hintergrundaufnahmen ohne Fluoreszenzfarbstoff angefertigt. Die Messtiefe betrug 30  $\mu\text{m}$  unter der Nierenkapsel, die mittels Second Harmonic Generation erfasst werden konnte. Bei der Second Harmonic Generation Technik nutzt man die Energie zweier Photonen zur Anregung und Reflektion eines neuen Photons mit doppelter Energie. Dieses Phänomen tritt auf, wenn zwei Photonen auf eine nicht-zentrosymmetrische Struktur wie die kollagenhaltige Nierenkapsel fallen (Oheim et al., 2006, Brown et al., 2013).

Es wurde eine Zeitserie aufgenommen, bei der im Abstand von 10 s sechs 16-Bit Aufnahmen mit 512x512 Pixel erzeugt wurden. So konnte das Risiko für eine Schädigung des Gewebes durch den Laser gering gehalten werden. Im Harnraum wurde in drei Messregionen und in den Kapillaren in zwei Messregionen zu jeweils 200 Pixeln die Hintergrundfluoreszenzintensität bestimmt.

Nach intravenöser Injektion von FITC-Albumin wurde die Messung mit gleichen

Einstellungen wiederholt. Die Fluoreszenzintensität wurde in drei Messregionen in den glomerulären Kapillaren ermittelt. Dabei war es wichtig, Regionen am äußeren Rand der Kapillaren auszuwählen, weil dort die Intensität am größten war. Im Lumen der Kapillaren war die Fluoreszenzintensität durch nicht gefärbte Erythrozyten vermindert und hätte die Messung beeinträchtigt. Im Harnraum wurden zwei Regionen vermessen, die nicht in der Nähe glomerulärer Kapillaren gelegen waren, um eine Verfälschung der Messung zu vermeiden (siehe Abbildung 9). Um dies zu gewährleisten, wurden zusätzlich Z-Stapel aufgenommen. Für jede Messregion wurde aus den zwei bzw. drei Messpunkten der Mittelwert kalkuliert und für die weiteren Berechnungen herangezogen.



**Abbildung 9: Bestimmung des glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin** A: In Hintergrundaufnahmen wurde vor der Injektion von FITC-Albumin die mittlere Fluoreszenzintensität im Harnraum und in den Kapillaren bestimmt. B: Unter gleichen Messbedingungen wurde nach der Farbstoffinjektion erneut die Fluoreszenzintensität im Harnraum und in den Kapillaren gemessen.

Nach Abschluss der Messung wurde der  $GSC_A$  nach folgender Formel erhoben:

$$GSC_{Albumin} = \frac{(Intensität\ Harnraum - Hintergrundintensität\ Harnraum)}{(Intensität\ glom.\ Kapillaren - Hintergrundintensität\ glom.\ Kapillaren)}$$

#### 4.6.2. Messeinstellung für die Bestimmung der $GSC_A$

Für jedes Glomerulum wurde eine Zeitserie mit 6 Zyklen im Abstand von 10 s in einer Tiefe von 30  $\mu m$  unter der Kapsel aufgenommen. Die Laserpower wurde konstant bei 6% gehalten (4140 mW, 800 nm). Die Verstärkung im grünen und

roten Kanal wurde auf 530 V/550 V und ein Detektorschwellenwert von -750/0 eingestellt. Die Aufzeichnung der Z-Stapel erfolgte wie unter III.4.3.3 erklärt.

#### **4.6.3. Dosierung und Aufreinigung des Farbstoffs FITC-Albumin**

Vorerst wurde eine 40 mg/ml Lösung von FITC-Albumin in isotoner Kochsalzlösung hergestellt. Jeweils 0,5 ml der Lösung wurden im Anschluss in einem Nanosep 30K centrifugal device vier Minuten bei 140000 rpm zentrifugiert. Mit Hilfe der Zentrifugation werden freie, nicht konjugierte Farbstoffmoleküle abgeschieden. Der Überstand wurde abpipettiert, auf ein Volumen von 0,5 ml aufgefüllt, aliquotiert und bei -20 C bis zum Gebrauch gelagert. FITC-Albumin kam in einer Dosierung von 1,0 µl/g KWG i.v. zum Einsatz.

#### **4.7. Filtration von Albumin**

Die filtrierte Menge an Albumin wurde aus der gemessenen Einzelnephron-GFR und dem  $GSC_A$  näherungsweise errechnet. Für die Berechnung wurden jeweils die Mittelwerte dieser beiden Parameter für jedes einzelne Versuchstier herangezogen. Zunächst erfolgte die Umrechnung der Einzelnephron GFR in l/min. Unter der Annahme einer Plasmaalbuminkonzentration von 38 g/l für Ratten wurde die Albuminfiltration in g/min bestimmt. Um die Filtration einer Einzelnieren pro Tag zu berechnen, wurde davon ausgegangen, dass sich eine Rattenniere aus 25 000 Nephronen zusammensetzt (Fassi et al., 1998). Folglich konnte die Albuminfiltration pro Niere und Tag ermittelt werden. Die Ergebnisse wurden mit scheinoperierten Kontrolltieren verglichen und als „Prozent von basal“ ausgedrückt.

#### **4.8. Ermittlung der Rückresorption von FITC-Albumin im S1-Segment des proximalen Tubulus**

Zur Bestimmung der tubulären Rückresorption von FITC-Albumin wurde die Fluoreszenzintensität im Anfangsabschnitt des proximalen Tubulus bestimmt. Als Bildgrundlage dienten Zeitserien, die wie unter III.4.6.2. beschrieben, aufgenommen wurden. Pro Niere wurden drei Glomeruli mit angrenzendem S1-Segment ausgewählt und mit jeweils 4 Messregionen zu 2000 Pixel versehen. Von der gemessenen Fluoreszenzintensität wurde die Hintergrundintensität abgezogen, die durch Autofluoreszenz des proximalen Tubulus zustande kommt. Die Hintergrundaufnahmen wurden vor Injektion des Farbstoffs FITC-Albumin mit gleichen Einstellungen erzeugt.

#### **4.9. Aus welcher Niere kommt das Albumin im Urin?**

Eine wichtige Fragestellung dieser Arbeit war es, die Herkunft des Albumins im Urin bei unilateraler Nierenarterienstenose zu ermitteln. Untersucht man gesunde Ratten, kann nahezu kein Albumin im Urin nachgewiesen werden. Folglich wird die filtrierte Albuminmenge annähernd vollständig im Tubulussystem rückresorbiert. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die mittels Multiphotonenmikroskopie ermittelte Rückresorption von FITC-Albumin in gesunden Kontrolltieren einer Resorptionsleistung von 100% entspricht. Um die im proximalen Tubulus effektiv rückresorbierte Menge pro Niere zu erhalten, wurde die ausgeschiedene Menge Albumin von der filtrierte Menge Albumin subtrahiert. Verglichen mit der Resorptionsleistung in Kontrolltieren konnte somit die resorbierte Albuminmenge der stenotischen und kontralateralen Nieren mit und ohne Losartanbehandlung ermittelt werden. Subtrahiert man also die Rückresorptionsleistung des proximalen Tubulus von der im Glomerulum filtrierte Albuminmenge, erhält man die ausgeschiedene Menge Albumin, die im Urin erscheint. Etwaige Ungenauigkeiten können dadurch entstehen, dass bei einer großen filtrierte Menge an Albumin, die Rückresorption nicht nur im S1-Segment des proximalen Tubulus stattfindet sondern auch in weiter distal gelegenen Abschnitten. Dadurch kann eine Differenz zwischen der berechneten Albuminausscheidung und der tatsächlich ausgeschiedenen Albuminmenge im Urin erklärt werden.

#### **4.10. Peritubuläre Extravasation**

Durch verringerten Blutfluss kann es zu einer gesteigerten vaskulären Permeabilität und der Entstehung von Ödemen im umliegenden Gewebe kommen. Um dies im 2K1C-Modell nachzuvollziehen, wurde der Grad der peritubulären Extravasation analysiert. Dafür wurde auf Höhe der peritubulären Gefäße eine Aufnahme (512x512 Pixel) mit einer Laserpower von 6% aufgezeichnet. Im Anschluss wurde die Fluoreszenzintensität von FITC-Albumin in den Kapillaren und im angrenzenden Interstitium in jeweils vier Messregionen pro Niere ermittelt und der Quotient für die Extravasation von FITC-Albumin gebildet.

### **5. Albuminausscheidung über den Urin**

Die Bestimmung des Albumin-Osmolalitäts-Quotienten wurde, wie unter III.2.4. im Detail beschrieben, durchgeführt. Um einen Basalwert der

Albuminausscheidung für jedes Tier zu bestimmen, wurde vor Implantation des Stenoseklips bzw. vor der Scheinoperation Spontanurin gesammelt. Drei Tage nach der Operation wurde erneut Urin gewonnen und analysiert.

## **6. Behandlung mit dem Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten Losartan**

Zur Untersuchung ob die hämodynamischen und funktionellen Veränderungen im 2K1C-Modell AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt sind, fand eine Behandlung der Tiere mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Losartan statt. Losartan wurde in einer Dosierung von 200 mg/l für 3 Tage über das Trinkwasser verabreicht. Die Behandlung begann unmittelbar nach dem Erwachen der Tiere aus der Narkose für die Implantation des Klips bzw. einer Scheinoperation. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte analog zu den unter III.3.3 und III.3.4. beschriebenen Versuchen.

Es ergab sich folglich eine Einteilung der Versuchstiere in vier Gruppen:

- scheinoperierte Kontrolltiere
- Tiere mit einseitiger Nierenarterienstenose
- scheinoperierte Tiere und Behandlung mit Losartan über das Trinkwasser
- Tiere mit einseitiger Nierenarterienstenose und Behandlung mit Losartan über das Trinkwasser

## **7. Statistik**

Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM kalkuliert. Die Analyse der Daten und die Erstellung der Graphen erfolgten mit Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism 5. Zur Ermittlung von Unterschieden wurde der Student-t-Test bzw. bei Bedarf ein einseitiger ANOVA-Test angewendet.

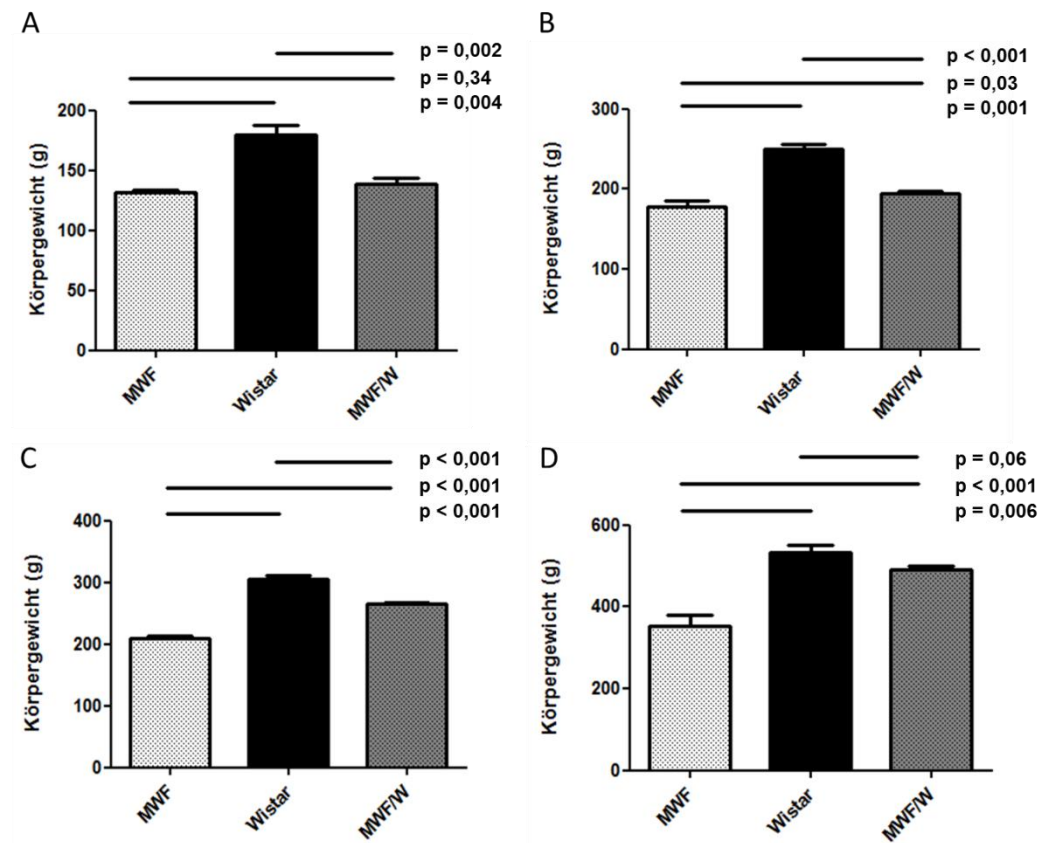
## **V. ERGEBNISSE**

### **1. Charakterisierung der F1-Generation der Kreuzungstiere aus MWF und Wistar Ratten**

Um einen Rattenstamm zu generieren, der eine unbeeinträchtigte Nierenfunktion zeigt und für die Untersuchung mittels Multiphotonen-Mikroskopie geeignet ist, wurden MWF und Wistar Ratten gekreuzt. Im Anschluss wurden wichtige physiologische Parameter untersucht.

#### **1.1. Bestimmung des Körpergewichts zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung**

Das Körpergewicht der Tiere wurde während ihrer Entwicklung zu verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert (6, 10, 14 und 26 Wochen). Im Alter von sechs Wochen lag die Körpermasse der MWF und MWF/W Tiere (MWF ♀:  $132 \text{ g} \pm 2$ , MWF ♂:  $178 \text{ g} \pm 7$ , MWF/W ♀:  $139 \text{ g} \pm 5$ , MWF/W ♂:  $195 \text{ g} \pm 3$ ) unter der der Wistar Ratten (Wistar ♀:  $180 \text{ g} \pm 8$ , Wistar ♂:  $251 \text{ g} \pm 6$ ). Im Laufe der Entwicklung konnten die MWF Ratten nur eine geringe Zunahme der Körpermasse erreichen. Im Alter von 6 Monaten hatten MWF ♀ ein Gewicht von nur  $209 \text{ g} \pm 4$  erreicht. MWF ♂ hatten ein Körpergewicht von  $352 \text{ g} \pm 2$ . Wistar und MWF/W Ratten erreichten in diesem Alter ein deutlich größeres Körpergewicht (Wistar ♀:  $306 \text{ g} \pm 5$ , Wistar ♂:  $533 \text{ g} \pm 17$ , MWF/W ♀:  $266 \text{ g} \pm 4$ , MWF/W ♂:  $491 \text{ g} \pm 10$ ). Trotz des anfänglich geringeren Gewichts erreichten die Kreuzungstiere folglich nahezu die Werte der Wistar Ratten. MWF/W litten somit unter einer geringeren Wachstumsretardierung als MWF Tiere.



**Abbildung 10: Entwicklung des Körpergewichts** Körpergewicht weiblicher (A) und männlicher (B) Ratten im Alter von 6 Wochen, Körpergewicht weiblicher (C) und männlicher (D) Tiere im Alter von 6 Monaten

### 1.2. Bestimmung der GFR in 6 Wochen und 6 Monate alten Tieren

Die glomeruläre Filtrationsrate ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion. Sie wurde nicht-invasiv durch die transkutane Bestimmung der FITC-Sinistrin Clearance ermittelt. Diese Technik ist kaum belastend für das Versuchstier, da weder eine langandauernde Narkose noch wiederholte Blutentnahmen nötig sind. In der folgenden Tabelle sind sowohl die gemessenen Absolutwerte als auch die GFR in Bezug auf 100 g Körpergewicht für sechs Wochen alte Tiere dargestellt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Rattenstämmen.

<b>GFR absolut (µl/min) sechs Wochen alter Ratten</b>			
	<b>Geschlecht</b>	<b>MW ± SEM</b>	<b>p-Wert</b>
MWF	♀	2,6 ± 0,002	
Wistar	♀	3,7 ± 0,6	0,13
MWF/W	♀	2,7 ± 0,2	0,38
MWF	♂	4,2 ± 0,4	
Wistar	♂	5,3 ± 0,5	0,13
MWF/W	♂	5,5 ± 0,5	0,11
<b>GFR/100g KGW (µl/min) sechs Wochen alter Ratten</b>			
MWF	♀	2,0 ± 0,01	
Wistar	♀	2,1 ± 0,3	0,72
MWF/W	♀	2,0 ± 0,1	0,61
MWF	♂	2,3 ± 0,2	
Wistar	♂	2,1 ± 0,2	0,44
MWF/W	♂	2,8 ± 0,2	0,13

**Tabelle 3: Glomeruläre Filtrationsrate in sechs Wochen alten Ratten** Die GFR wurde getrennt für beide Geschlechter in Absolutwerten und bezogen auf 100/g KGW bestimmt. Die Messwerte wurden mit MWF Tieren des jeweiligen Geschlechts verglichen. Die p-Werte sind immer in Bezug auf die MWF Tiere angegeben.

Die GFR Messung wurde in sechs Monate alten Ratten auf gleiche Weise wiederholt. Die GFR/100 g KGW zeigte keine deutlichen Unterschiede, mit Ausnahme der MWF/W ♂. Sie erreichten eine deutlich größere Filtrationsrate. Betrachtet man die Absolutwerte, so wird deutlich, dass MWF/W ♀, Wistar ♀ und MWF/W ♂ eine höhere GFR zeigten als MWF ♀ bzw. MWF ♂.

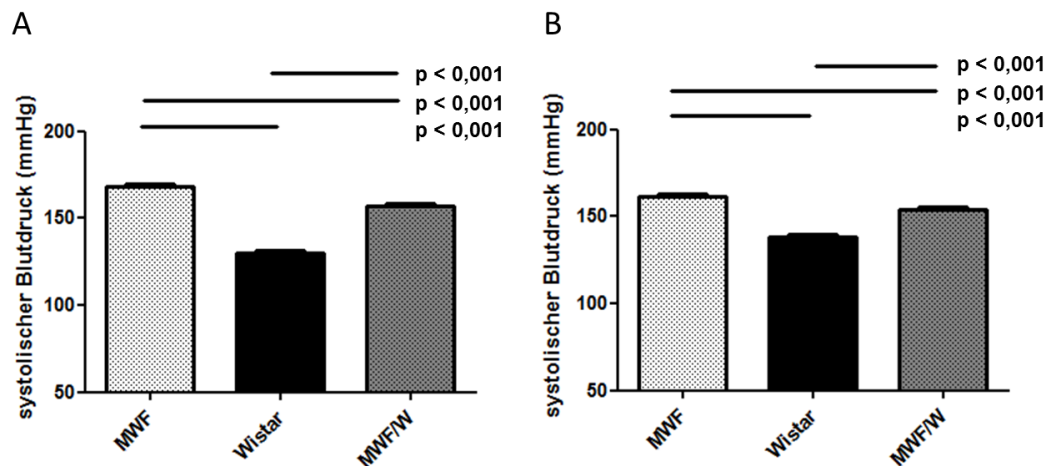


<b>GFR absolut (µl/min) sechs Monate alter Ratten</b>			
	<b>Geschlecht</b>	<b>MW ± SEM</b>	<b>p-Wert</b>
MWF	♀	2,9 ± 0,2	
Wistar	♀	4,4 ± 0,8	0,17
MWF/W	♀	4,3 ± 0,2	0,009
MWF	♂	4,5 ± 0,4	
Wistar	♂	9,3 ± 1,0	0,01
MWF/W	♂	10,5 ± 1,0	0,007
<b>GFR/100g KGW (µl/min) sechs Monate alter Ratten</b>			
MWF	♀	1,4 ± 0,1	
Wistar	♀	1,4 ± 0,3	0,94
MWF/W	♀	1,6 ± 0,1	0,24
MWF	♂	1,3 ± 0,1	
Wistar	♂	1,7 ± 0,1	0,07
MWF/W	♂	2,2 ± 0,2	0,02

**Tabelle 4: Glomeruläre Filtrationsrate in sechs Monate alten Tieren** Die GFR wurde erneut in männlichen und weiblichen Tieren gemessen und mit MWF ♀/♂ verglichen.

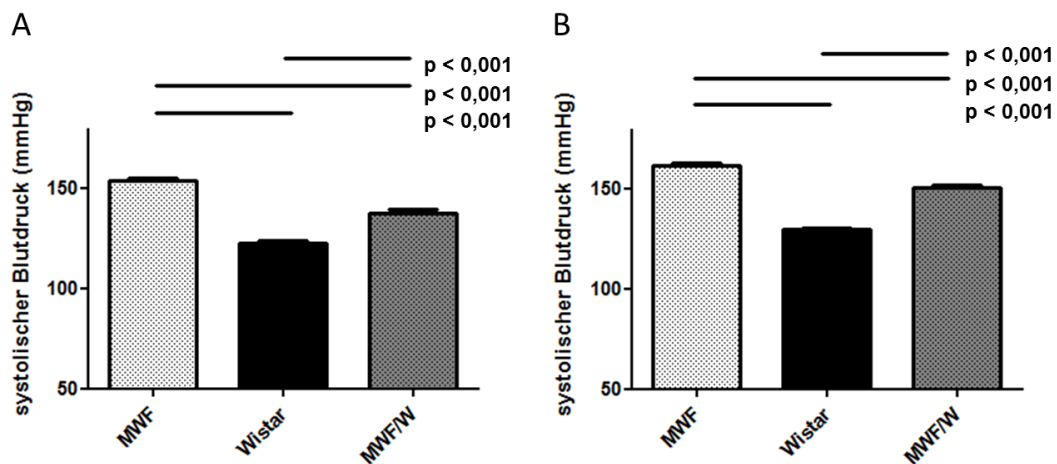
### 1.3. Blutdruckmessung

Als weiterer Parameter, der Einfluss auf die Nierenfunktion nehmen kann, wurde der Blutdruck bei wachen Ratten mit Hilfe der nicht-invasiven Tail-Cuff-Methode ermittelt. Diese Methode bietet, nachdem die Tiere an die Versuchsbedingungen gewöhnt wurden, den großen Vorteil, dass keine Narkose nötig ist. Die Analysewerte sind deshalb unverfälscht. Für die statistische Auswertung wurde der systolische Blutdruck genutzt. Wie zu erwarten war, zeigten sowohl weibliche als auch männliche MWF Ratten bereits im Alter von sechs Wochen eine Hypertonie (MWF ♀: 168 mmHg ± 1, MWF ♂: 162 mmHg ± 1). Der systolische Blutdruck der Wistar Ratten lag in einem physiologischen Bereich (Wistar ♀: 130 mmHg ± 1, Wistar ♂: 138 mmHg ± 2). Durch Kreuzung der MWF Ratten mit Wistar Ratten wurde eine signifikante Senkung des Blutdrucks erreicht (MWF/W ♀: 157 mmHg ± 1, MWF/W ♂: 154 mmHg ± 1).



**Abbildung 11: Systolischer Blutdruck der sechs Wochen alten Versuchstiere** Sowohl in weiblichen (A) als auch männlichen Tieren (B) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Stämmen gemessen.

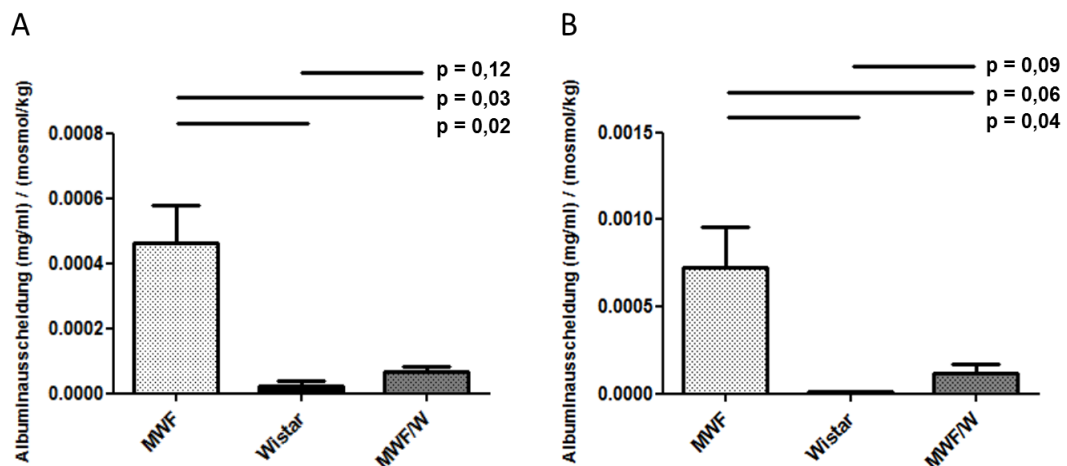
Im Alter von 6 Monaten wurde erneut der systolische Blutdruck gemessen. MWF Ratten zeigten abermals hohe Werte (MWF ♀: 154 mmHg  $\pm$  1, MWF ♂: 162 mmHg  $\pm$  1). Bei Wistar und MWF/W Tieren wurden deutlich niedrigere Werte ermittelt (Wistar ♀: 122 mmHg  $\pm$  1, Wistar ♂: 130 mmHg  $\pm$  1, MWF/W ♀: 138 mmHg  $\pm$  1, MWF/W ♂: 151 mmHg  $\pm$  1). Vor allem bei den weiblichen MWF/W Tieren wurde durch Kreuzung der beiden Ausgangsstämme eine signifikante Verbesserung des Blutdrucks erreicht.



**Abbildung 12: Systolischer Blutdruck sechs Monate alter Tiere** Auch in älteren weiblichen (A) und männlichen (B) Tieren zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen. Durch Kreuzung wurde folglich eine Reduktion der Hypertonie erreicht. MWF/W ♀ liegen im physiologischen Bereich.

#### 1.4. Albuminausscheidung

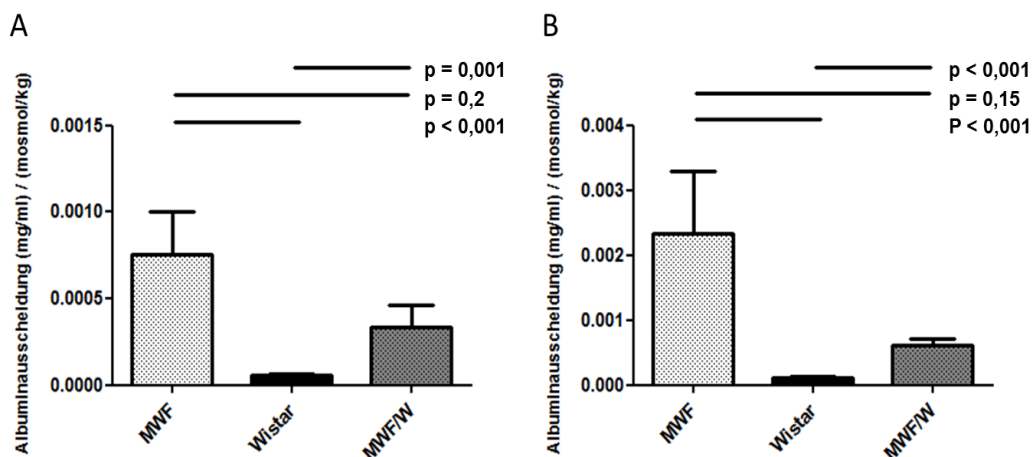
Die Entwicklung einer Albuminurie ist Kennzeichen vieler Nierenerkrankungen und weist häufig auf Läsionen in der glomerulären Filtrationsbarriere hin. Eine vermehrte Albuminfiltration kann teilweise durch gesteigerte tubuläre Rückresorption kompensiert werden. Die Ursache einer Albuminurie kann sehr unterschiedlich sein. Eine wichtige Rolle dabei spielt jedoch häufig ein erhöhter systemischer Blutdruck, wie er auch in MWF Ratten gefunden wurde. Die Albuminausscheidung wurde im Folgenden als Albumin-Osmolalitäts-Quotient ((mg/ml)/(mosmol/kg)) ausgedrückt. MWF Ratten weisen bereits im Alter von 6 Wochen eine vermehrte Albuminausscheidung auf (MWF ♀:  $0,00046 \pm 0,00011$ , MWF ♂:  $0,00072 \pm 0,00023$ ). Wistar und MWF/W Tiere scheiden sehr viel weniger Albumin aus (Wistar ♀:  $0,000021 \pm 0,000016$ , Wistar ♂:  $0,000010 \pm 0,000003$ , MWF/W ♀:  $0,00007 \pm 0,00002$ , MWF/W ♂:  $0,00012 \pm 0,00005$ ).



**Abbildung 13: Albumin-Osmolalitäts-Quotient der sechs Wochen alten Tiere** weibliche Ratten (A), männliche Ratten (B). Aus Spontanurin wurde die Albuminexkretion quantifiziert. Wistar und MWF/W Ratten zeigen eine geringere Albuminausscheidung als MWF Ratten.

Mit zunehmendem Alter (6 Monate) nimmt die Albuminexkretion über den Urin in MWF Ratten zu. Davon sind vor allem männliche Tiere betroffen (MWF ♀:  $0,00076 \pm 0,00243$ , MWF ♂:  $0,00234 \pm 0,00096$ ). Die Werte der Wistar Ratten nehmen ebenfalls etwas zu, bleiben aber auf einem niedrigen Niveau (Wistar ♀:  $0,00005 \pm 0,00001$ , Wistar ♂:  $0,00011 \pm 0,00001$ ). Auch die Albuminausscheidung der MWF/W Ratten nimmt zu (MWF/W ♀:  $0,00033 \pm 0,00013$ , MWF/W ♂:  $0,00060 \pm 0,00011$ ). Im Vergleich zu MWF ♀/♂ beträgt sie jedoch

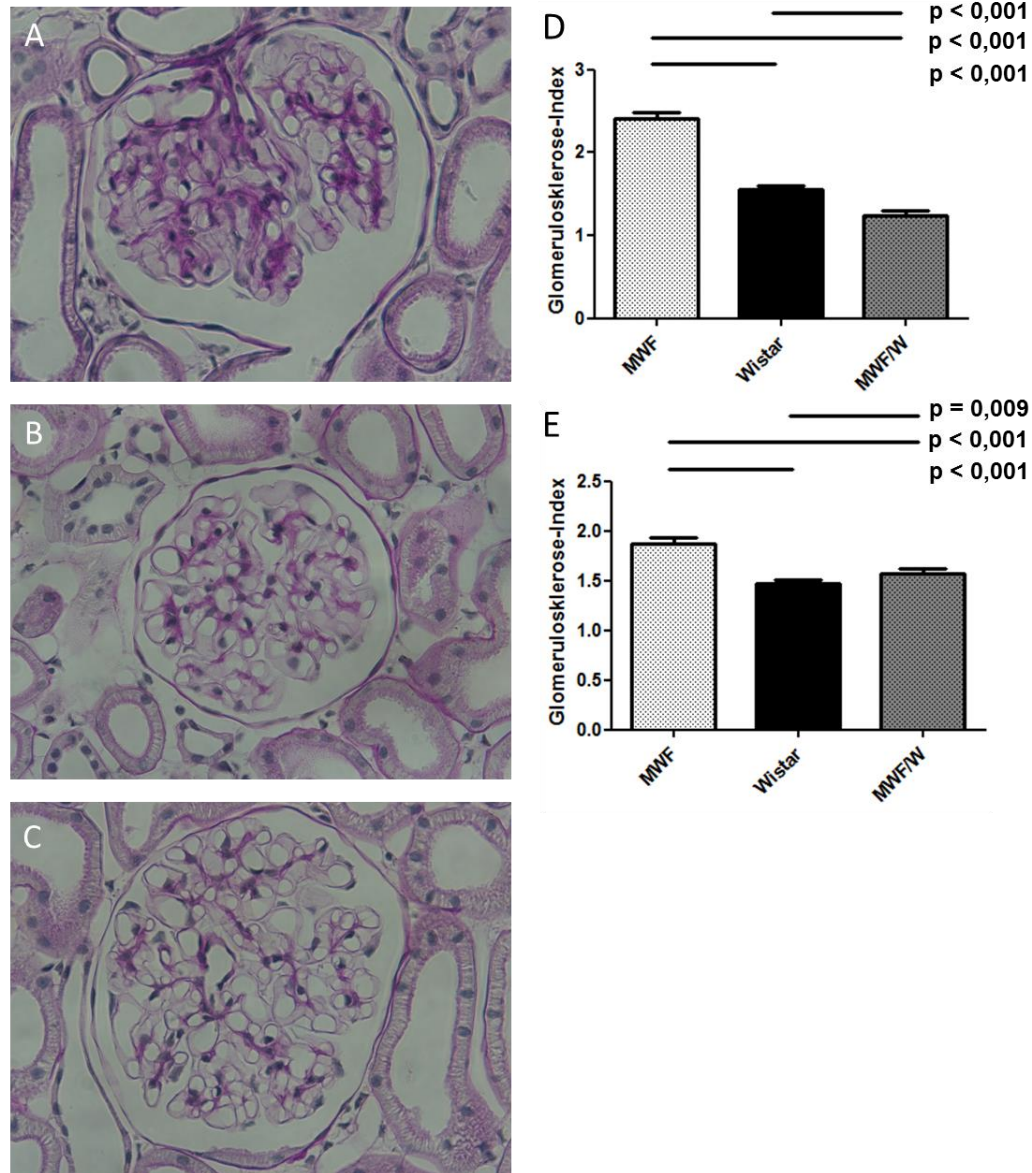
weniger als die Hälfte bzw. nur ein Viertel.



**Abbildung 14: Albumin-Osmolalitäts-Quotient der sechs Monate alten Ratten** weibliche Tiere (A), männliche Tiere (B). Mit zunehmendem Alter wurde eine größere Menge Albumin in allen Gruppen ausgeschieden. MWF Ratten zeigten dabei im Alter die höchste Albuminausscheidung.

### 1.5. Glomerulosklerose-Index

Durch das chronische Vorliegen einer Hypertonie kann es zur Manifestierung glomerulosklerotischer Nierenveränderungen kommen. Aus diesem Grund wurde der Glomerulosklerose-Index in PAS-gefärbten Schnitten sechs Monate alter Tiere bestimmt. Es wurden erneut sowohl weibliche als auch männliche Tiere der drei Stämme verglichen. Für MWF Ratten ergab sich ein Index von  $2,4 \pm 0,08$  für die weiblichen Tiere und  $1,9 \pm 0,05$  für die männlichen Tiere. In Wistar Ratten wurden deutlich weniger Anzeichen einer Sklerose festgestellt (Wistar ♀:  $1,6 \pm 0,05$ , Wistar ♂:  $1,5 \pm 0,04$ ). Auch in MWF/W Ratten konnten kaum sklerotische Veränderungen gefunden werden (MWF/W ♀:  $1,2 \pm 0,05$ , MWF/W ♂:  $1,6 \pm 0,05$ ).

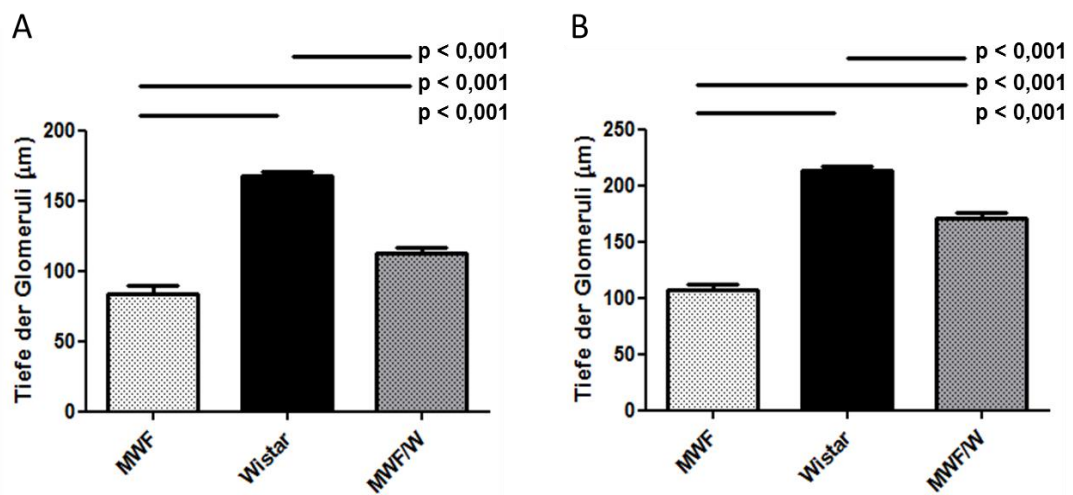


**Abbildung 15: Glomerulosklerotische Veränderungen** A-C: repräsentative PAS-Färbung zur Bestimmung des Grades der glomerulosklerotischen Läsionen. In MWF Tieren (A) zeigten sich deutlich stärkere Veränderungen als in Wistar (B) und MWF/W Ratten (C). Quantifizierung des Glomerulosklerose-Index in weiblichen (D) und männlichen (E) Tieren.

### 1.6. Tiefe der Glomeruli unter der Nierenkapsel

Um die glomeruläre Funktion mittels Multiphotonen-Mikroskopie untersuchen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, eine ausreichende Anzahl oberflächlicher Glomeruli zur Verfügung zu haben. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden, wie bereits erwähnt, bevorzugt MWF Ratten dafür eingesetzt. Auf H&E gefärbten Schnitten wurde die Tiefe der Glomeruli unter der Nierenkapsel bestimmt, um zu überprüfen, ob sich MWF/W für die Multiphotonen-Mikroskopie eignen. In die Statistik wurden die 30 oberflächlichsten Glomeruli

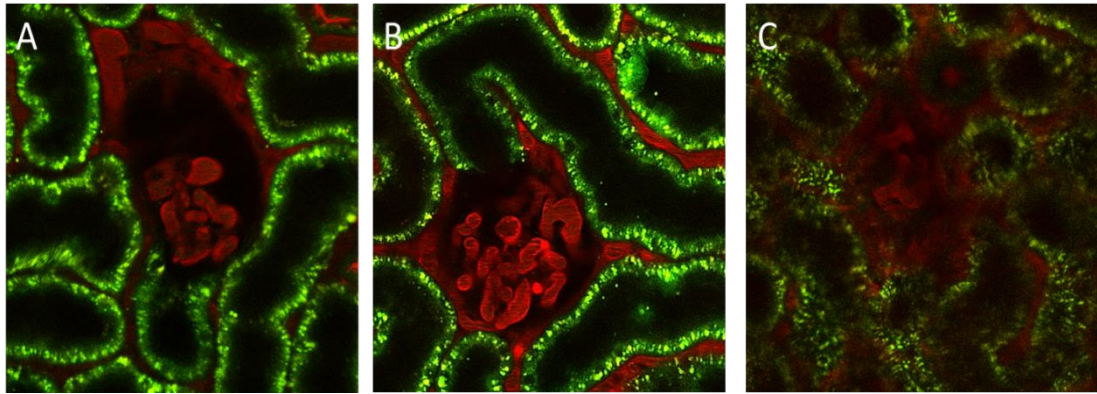
pro Nierenschnitt miteinbezogen. In jungen, weiblichen MWF Ratten lagen die Glomeruli im Durchschnitt  $84 \mu\text{m} \pm 6$  unter der Nierenkapsel, in männlichen Tieren  $107 \mu\text{m} \pm 6$ . In Wistar Ratten sind kaum oberflächliche Glomeruli zu finden (Wistar ♀:  $168 \pm 30$ , Wistar ♂:  $213 \mu\text{m} \pm 4$ ). Die Glomeruli waren in MWF/W Ratten deutlich oberflächlicher lokalisiert als in Wistar Ratten (MWF/W ♀:  $113 \mu\text{m} \pm 4$ , MWF/W ♂:  $171 \mu\text{m} \pm 6$ ). Auch in sechs Monate alten Ratten zeigte sich eine sehr ähnliche Verteilung (MWF♀:  $73 \mu\text{m} \pm 8$ , MWF ♂:  $96 \mu\text{m} \pm 8$ , Wistar ♀:  $155 \mu\text{m} \pm 5$ , Wistar ♂:  $251 \mu\text{m} \pm 10$ , MWF/W ♀:  $117 \mu\text{m} \pm 8$ , MWF/W ♂:  $185 \mu\text{m} \pm 11$ ).



**Abbildung 16: Durchschnittliche Tiefe der 30 oberflächlichsten Glomeruli unter der Nierenkapsel** weibliche sechs Wochen alte Tiere (A), weibliche sechs Monate alte Tiere (B) MWF/W Ratten zeigen deutlich mehr oberflächliche Glomeruli als Wistar Ratten.

Um diese Befunde zu verifizieren, wurden Multiphotonen-mikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Stämme im Alter von sechs Wochen angefertigt. Es zeigte sich, dass in MWF und MWF/W ♀ vergleichbar viele oberflächliche Glomeruli sichtbar gemacht werden konnten, wohingegen es in Wistar Ratten sehr schwierig war, Glomeruli in guter Qualität darzustellen. Als besonders geeignet stellten sich folglich weibliche MWF/W Ratten heraus.





**Abbildung 17: Multiphotonen-mikroskopische Aufnahmen** Durch intravenöse Injektion von Alexa 594-BSA wurden die Kapillarschlingen sichtbar gemacht. A-C, repräsentative Aufnahmen oberflächlicher Glomeruli im MWF (A), MWF/W (B) und Wistar Ratten (C). In MWF und MWF/W Tieren konnten Glomeruli in guter Qualität dargestellt werden. In Wistar Ratten waren kaum Glomeruli in der Reichweite des Lasers auffindbar.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die Kreuzung von MWF und Wistar Ratten, ein Rattenstamm erzeugt werden kann, der sich sehr gut für die Untersuchung der Nierenfunktion mittels Multiphotonen-Mikroskopie eignet. Im Vergleich zu MWF Ratten zeigten MWF/W Ratten eine deutlich geringere Wachstumsretardierung. Der Blutdruck und die Albuminausscheidung konnten durch die Kreuzung deutlich gesenkt werden. Histologisch zeigten sie signifikant weniger glomerulosklerotische Läsionen. Die GFR war in jungen Tieren vergleichbar. Der Abfall der GFR/ g KGW im Alter, der vor allem in männlichen MWF Ratten in Erscheinung tritt, war in MWF/W ♂ nicht so stark ausgeprägt. Außerdem war eine genügend große Anzahl oberflächlicher Glomeruli für die Anregung mittels Zwei-Photonen-Laser vorhanden.

Mit diesem Rattenstamm wurden Versuchstiere generiert, die sich für die Multiphotonen-Mikroskopie eignen und eine normale Nierenfunktion zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Untersuchungen deshalb an MWF/W Tieren im Alter von ca. 6 Wochen durchgeführt.

## 2. Häodynamische Veränderungen im 2K1C-Modell

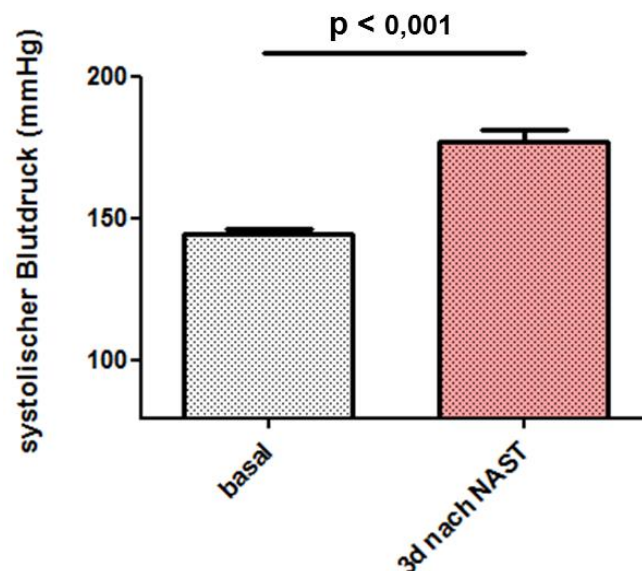
### 2.1. Blutdruck

Durch die unilaterale Verengung der A. renalis und dem damit einhergehenden verminderten Perfusionsdruck in dieser Niere kommt es zu der Entstehung einer renovaskulären Hypertonie. Um dieses Kardinalsymptom auch im angewendeten

Tiermodell nachvollziehen zu können, wurden Blutdruckmessungen in allen vier Tiergruppen durchgeführt.

### 2.1.1. Systolischer Blutdruck mit der Tail-Cuff Methode

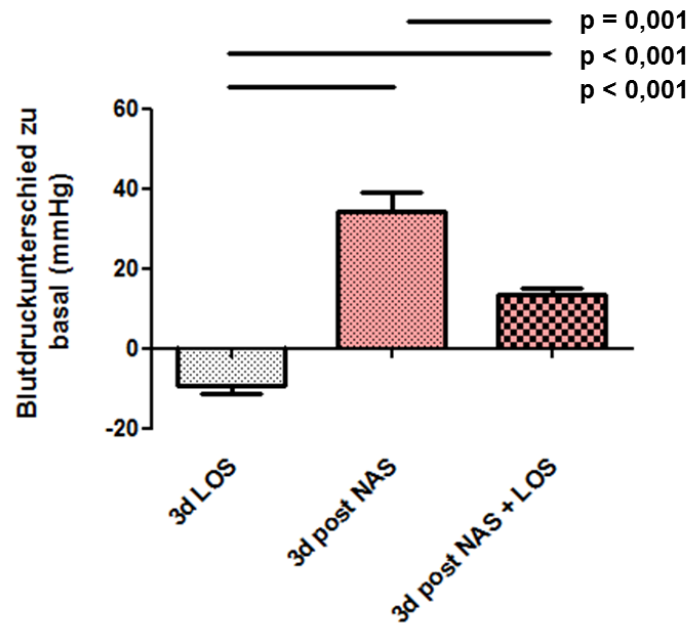
Um zu verifizieren, dass die Stenose durch den implantierten Klip ausreichend war, um eine arterielle Hypertonie auszulösen, wurden systolische Blutdruckmessungen mit der Tail-Cuff Methode am wachen Versuchstier durchgeführt. Bereits drei Tage nach der Operation war der Blutdruck im Vergleich zur Basalmessung signifikant angestiegen ( $145 \text{ mmHg} \pm 1$  vs.  $177 \text{ mmHg} \pm 4$ ,  $n=10$ ,  $p<0,001$ ). Der systolische Blutdruck stieg im Mittel um  $32 \text{ mmHg}$ .



**Abbildung 18: Systolische Blutdruckmessung** Der Blutdruck wurde bei MWF/W Ratten mittels Tail-Cuff Methode gemessen. Am Tag 3 nach der experimentellen Nierenarterienstenose ergab sich ein signifikanter Blutdruckanstieg im Vergleich zur Basalmessung.

Durch die Behandlung mit Losartan kam es zu einem Abfall des systolischen Blutdrucks in den scheinoperierten Tieren um durchschnittlich  $9 \text{ mmHg}$  im Vergleich zur Basalmessung ( $152 \text{ mmHg} \pm 2$  vs.  $143 \text{ mmHg} \pm 2$ ,  $n=8$ ,  $p=0,007$ ). Bei Tieren die mit Losartan behandelt wurden, fiel der Blutdruckanstieg mit durchschnittlich  $13 \text{ mmHg} \pm 3$  nach Stenoseimplantation sehr moderat aus ( $150 \text{ mmHg} \pm 2$  vs.  $163 \text{ mmHg} \pm 2$ ,  $n=9$ ,  $p<0,001$ ). Die Entwicklung einer Hypertonie wurde durch die Behandlung folglich signifikant abgeschwächt ( $177 \text{ mmHg} \pm 4$ ,  $n=10$ , vs.  $163 \text{ mmHg} \pm 2$ ,  $n=9$ ,  $p=0,001$ ).

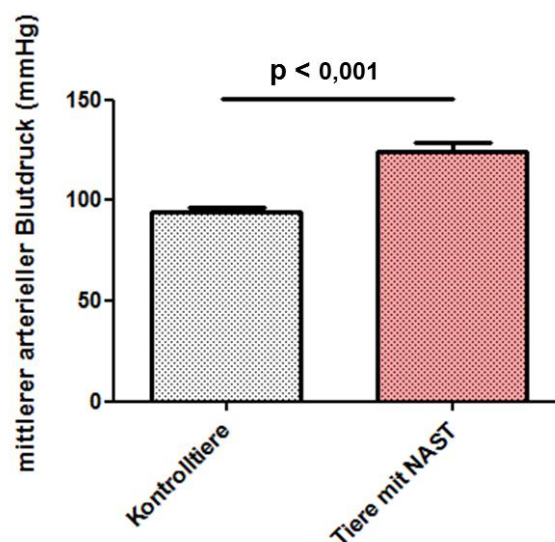




**Abbildung 19: Einfluss von Losartan auf den systolischen Blutdruck** Unter Losartan kam es zu einem leichten Blutdruckabfall in den scheinooperierten Tieren. Der starke Blutdruckanstieg durch die experimentelle NAST wurde unter Losartan deutlich abgeschwächt.

### 2.1.2. Mittlerer arterieller Blutdruck unter Isoflurannarkose

Während der Experimente am Multiphotonen-Mikroskop wurde kontinuierlich der mittlere arterielle Blutdruck überwacht. In den Kontrolltieren, die 3 Tage zuvor scheinooperiert wurden, lag der mittlere Blutdruck bei  $94 \text{ mmHg} \pm 2$  ( $n=7$ ). In den Tieren mit Nierenarterienstenose war er mit  $125 \text{ mmHg} \pm 4,5$  ( $n=8$ ,  $p<0,001$ ) deutlich höher.



**Abbildung 20: Mittlerer arterieller Blutdruck unter Isoflurannarkose** Der Blutdruck wurde über die Gesamtdauer der MPM-Experimente in Kontrollratten und in Ratten mit

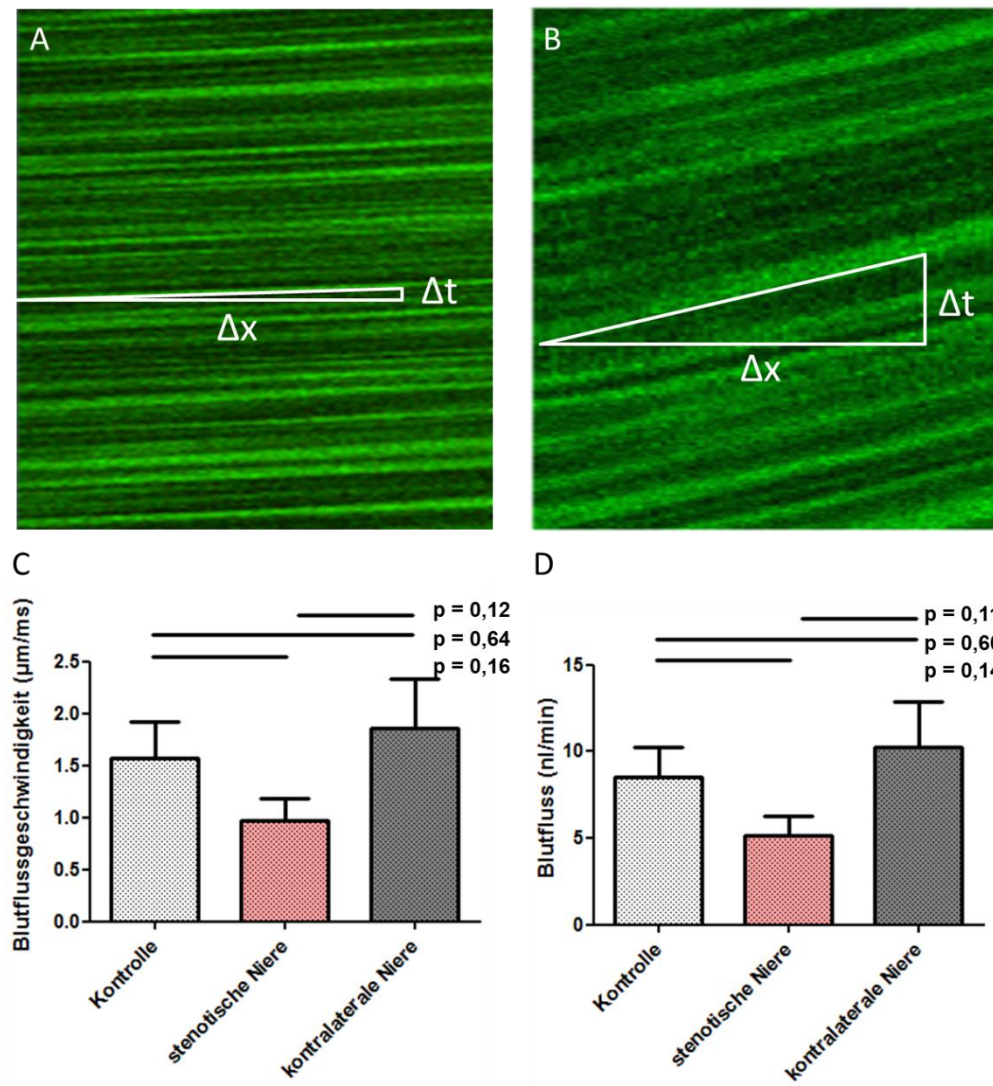
Stenose gemessen. Es wurde ein deutlich höherer Blutdruck in Ratten mit unilateraler Nierenarterienstenose registriert.

Der blutdrucksenkende Effekt von Losartan wurde auch unter Isoflurannarkose deutlich. Losartan behandelte, scheinoperierte Kontrolltiere zeigten einen mittleren arteriellen Blutdruck von  $86 \text{ mmHg} \pm 2$  ( $n=7$ ) im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ( $94 \text{ mmHg} \pm 2$ ,  $n=7$ ,  $p=0,016$ ). Auch in Tieren mit unilateraler Nierenarterienstenose wurde eine Blutdrucksenkung durch die Losartan Behandlung erzielt (NAST  $125 \text{ mmHg} \pm 5$ ,  $n=8$ , vs. NAST + LOS  $95 \text{ mmHg} \pm 3$ ,  $n=10$ ,  $p<0,001$ ).

## **2.2. Peritubulär-kapilläre Blutflussgeschwindigkeit und Blutfluss**

Anhand der Messung der Blutflussgeschwindigkeit in den peritubulären Kapillaren können Rückschlüsse auf den Blutfluss und die Durchblutung der Niere gezogen werden. Deshalb wurden diese Messungen sowohl in der stenotischen als auch in der kontralateralen Niere durchgeführt. Als Referenz diente die Blutflussgeschwindigkeit in den peritubulären Kapillaren scheinoperierter Tiere (Kontrolle:  $1,6 \mu\text{m/ms} \pm 0,3$ ,  $n=7$ , stenotische Niere:  $1,0 \mu\text{m/ms} \pm 0,2$ ,  $n=7$ ,  $p=0,14$ , kontralaterale Niere  $1,9 \mu\text{m/ms} \pm 0,5$ ,  $n=8$ ,  $p=0,60$ ). Unter Einbeziehung des Radius der gemessenen Gefäße ergeben sich für den peritubulären Blutfluss ähnliche Verhältnisse. Als Referenzwert diente der Blutfluss in scheinoperierten Tieren (Kontrolle:  $8,5 \text{ nl/min} \pm 1,8$ ,  $n=7$ , stenotische Niere:  $5,1 \text{ nl/min} \pm 1,1$ ,  $n=7$ ,  $p=0,16$ , kontralaterale Niere:  $10,2 \text{ nl/min} \pm 2,6$ ,  $n=8$ ,  $p=0,64$ ).

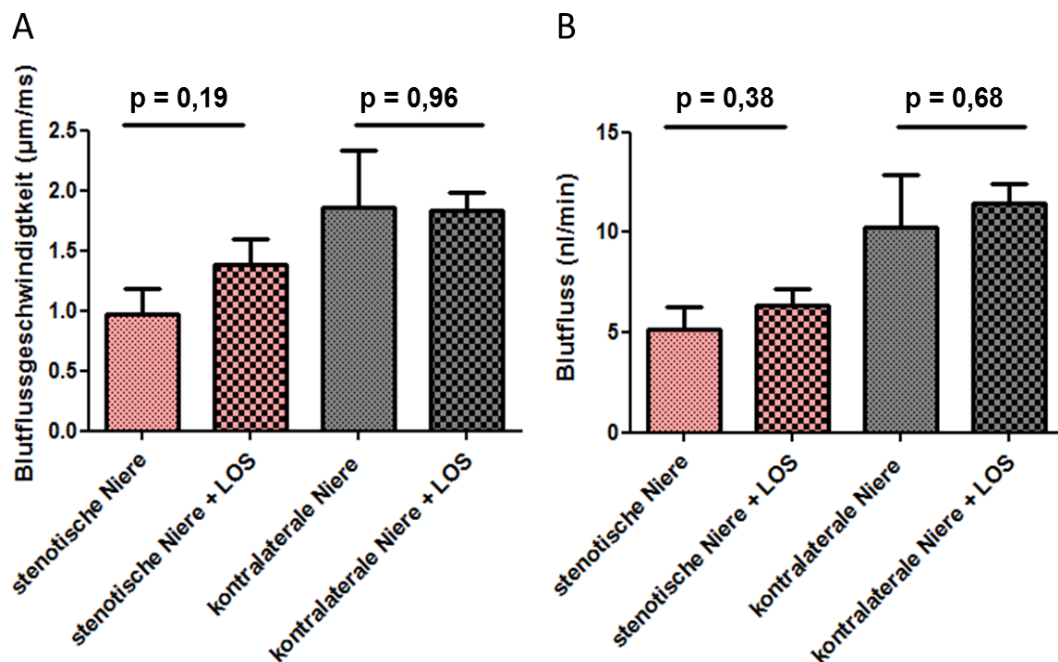
Obwohl keine signifikanten Unterschiede sichtbar wurden, zeigte sich dennoch, dass der Blutfluss in der geklippten Niere im Vergleich zur Kontrolle um ca. 40% verringert und in der kontralateralen Seite um ca. 20% erhöht ist.



**Abbildung 21: Peritubulär-kapilläre Blutflussgeschwindigkeit und Blutfluss** Anhand der zurückgelegten Wegstrecke ( $\Delta x$ ) eines ungefärbten Erythrozyten in einer gewissen Zeit ( $\Delta t$ ) wurde die Blutflussgeschwindigkeit bestimmt. A: Schnelle Blutflussgeschwindigkeit, B: langsame Blutflussgeschwindigkeit, C: In der stenotischen Niere wurden langsamere Blutflussgeschwindigkeiten als in der Kontrollniere erreicht. Die Blutflussgeschwindigkeit in der kontralateralen Niere war im Vergleich zur Kontrolle um ca. 20% erhöht. D: Der Blutfluss war in der stenotischen Niere geringgradig langsamer und in der kontralateralen Niere geringgradig schneller als in der Kontrollniere.

In der stenotischen Niere war auch unter dem Einfluss von Losartan die Blutflussgeschwindigkeit mit  $1,4 \mu\text{m/ms} \pm 0,2$  vergleichsweise gering. In der kontralateralen Niere herrschte eine Flussgeschwindigkeit von  $1,8 \mu\text{m/ms} \pm 0,14$ . Ähnliche Befunde wurden für den Blutfluss ermittelt. Durch die Behandlung mit Losartan konnte weder in der geklippten Niere (stenotische Niere  $5,1 \text{ nl/min} \pm 1,1$   $n=7$  vs. stenotische Niere + Losartan  $6,4 \text{ nl/min} \pm 0,8$ ,  $n=9$ ,  $p=0,38$ ) noch in der kontralateralen Niere (kontralaterale Niere  $10,2 \text{ nl/min} \pm 2,6$ ,  $n=8$  vs.

kontralaterale Niere + LOS  $11,24 \text{ nl/min} \pm 1,0$ ,  $n=8$ ,  $p=0,68$ ) ein Effekt auf den Blutfluss beobachtet werden.



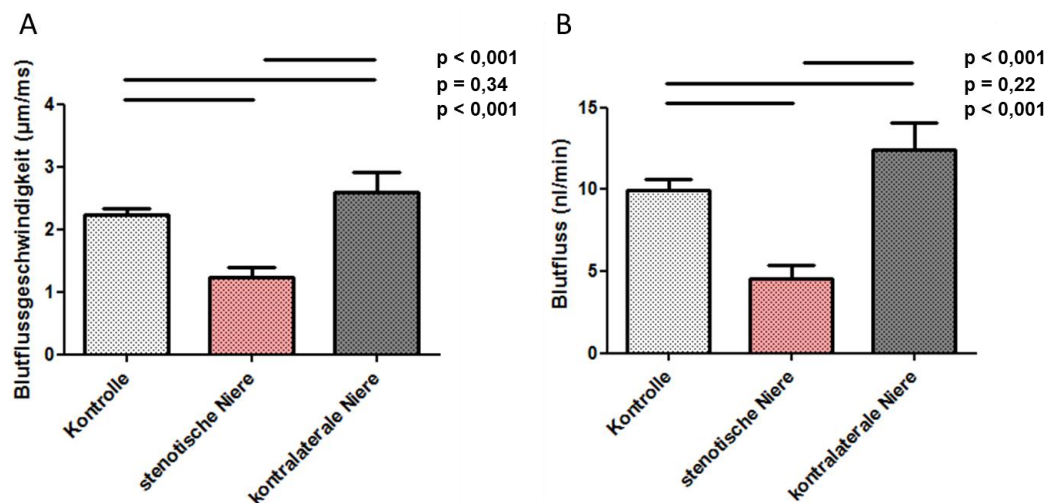
**Abbildung 22: peritubuläre Blutflussgeschwindigkeit und Blutfluss unter der Behandlung mit Losartan** Losartan hatte weder in der stenotischen Niere noch in der kontralateralen Niere einen Effekt auf den Blutfluss (B) und die Blutflussgeschwindigkeit (C).

### 2.3. Glomerulär-kapilläre Blutflussgeschwindigkeit und Blutfluss

Da die glomeruläre Filtrationsleistung der Niere perfusionsabhängig ist, war es von besonderem Interesse die glomerulär-kapilläre Durchblutung im 2K1C-Modell zu untersuchen. Unter physiologischen Bedingungen wird die Durchblutung der Nierenkörperchen durch die renale Autoregulation konstant gehalten. Um eine Aussage zur Durchblutung der Glomeruli in diesem Modell der renovaskulären Hypertonie machen zu können, wurden die Blutflussgeschwindigkeit und der Blutfluss in den glomerulären Kapillaren gemessen.

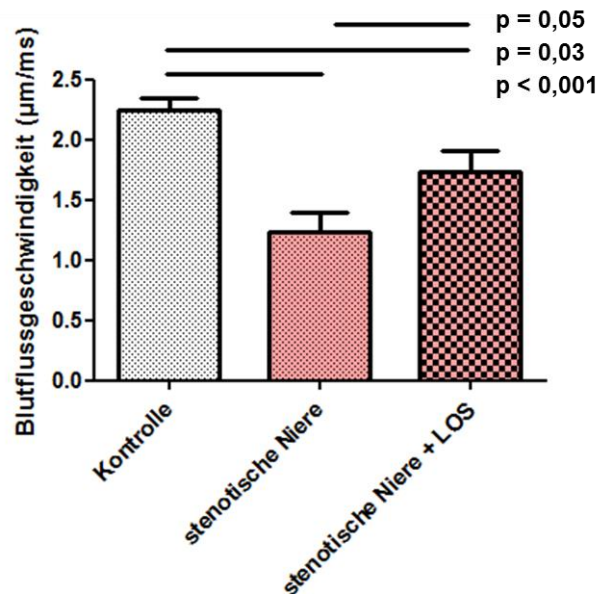
In der stenotischen Niere war die Blutflussgeschwindigkeit verglichen mit den Kontrollnieren deutlich verringert (Kontrolle:  $2,2 \mu\text{m/ms} \pm 0,1$ ,  $n=7$  vs. stenotische Niere  $1,1 \mu\text{m/ms} \pm 0,2$ ,  $n=10$ ,  $p<0,001$ ). Auch der Blutfluss war in der geklippten Niere signifikant verringert (Kontrolle:  $9,9 \text{ nl/min} \pm 0,7$ ,  $n=7$  vs. stenotische Niere  $4,6 \text{ nl/min} \pm 0,8$ ,  $n=10$ ,  $p<0,001$ ). In der kontralateralen Niere war sowohl die Blutflussgeschwindigkeit ( $2,6 \mu\text{m/ms} \pm 0,3$ ,  $n=9$ ,  $p=0,34$ ) als auch der Blutfluss ( $12,5 \text{ nl/min} \pm 1,6$ ,  $n=9$ ,  $p=0,22$ ) im Vergleich zu Kontrolltieren geringgradig

gesteigert (16 bzw. 20%). Im akuten Stadium einer unilateralen Nierenarterienstenose konnte folglich in beiden Nieren bereits eine veränderte Perfusion der Nierenkörperchen festgestellt werden.



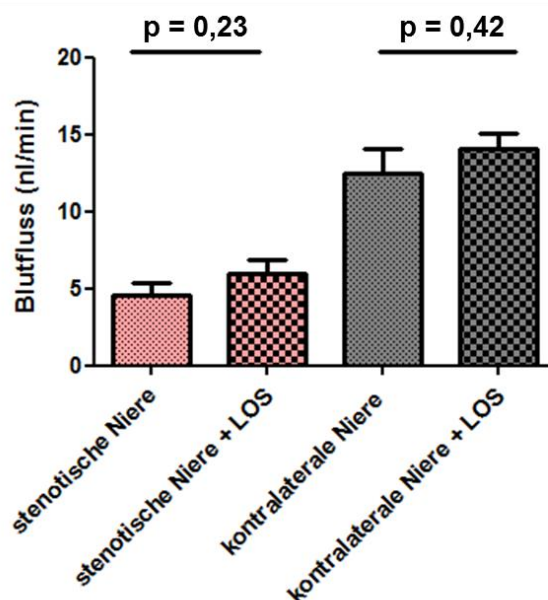
**Abbildung 23: glomerulär-kapilläre Blutflussgeschwindigkeit und Blutfluss** Durch Implantation des Stenoseklips kam es zu einer deutlichen Verringerung der Blutflussgeschwindigkeit (A) und des Blutflusses (B) in der stenotischen Niere. Auch in der kontralateralen Seite zeigten sich leichte Veränderungen beider Parameter.

Bei der Wiederholung des Experiments unter Losartan-Therapie war die Blutflussgeschwindigkeit in der stenotischen Niere ( $1,7 \mu\text{m/ms} \pm 0,2$ ,  $n=9$ ) im Vergleich zur unbehandelten stenotischen Niere ( $1,2 \mu\text{m/ms} \pm 0,2$ ,  $n=10$ ,  $p=0,05$ ) signifikant höher. Verglichen mit scheinoperierten, unbehandelten Kontrolltieren ( $2,2 \mu\text{m/ms} \pm 0,1$ ,  $n=7$ ,  $p=0,03$ ) war jedoch die Blutflussgeschwindigkeit trotz der Behandlung mit Losartan signifikant verringert. Die Blutflussgeschwindigkeit in der kontralateralen Niere ( $2,6 \mu\text{m/ms} \pm 0,2$ ,  $n=9$ ) war vergleichbar mit der in der kontralateralen Niere ohne medikamentöse Behandlung ( $2,6 \mu\text{m/ms} \pm 0,3$ ,  $n=9$ ,  $p=0,93$ ).



**Abbildung 24: glomerulär-kapilläre Blutflussgeschwindigkeit** Unter der Therapie mit Losartan kam es zu einer erhöhten Blutflussgeschwindigkeit in der stenotischen Niere. Die Blutflussgeschwindigkeit lag jedoch trotzdem deutlich unter dem Kontrollniveau.

Die Ergebnisse der Blutflussmessungen unter dem Einfluss des Angiotensin II-Rezeptor-Blockers in der stenotischen Niere ( $6,0 \text{ nl/min} \pm 0,9$ ,  $n=9$ ) und in der kontralateralen Niere ( $14,1 \text{ nl/min} \pm 1,0$ ,  $n=9$ ) waren vergleichbar mit den Ergebnissen in unbehandelten stenotischen ( $4,6 \text{ nl/min} \pm 0,8$ ,  $n=10$ ,  $p=0,23$ ) und kontralateralen Nieren ( $12,46 \text{ nl/min} \pm 1,6$ ,  $n=9$ ,  $p=0,42$ ).



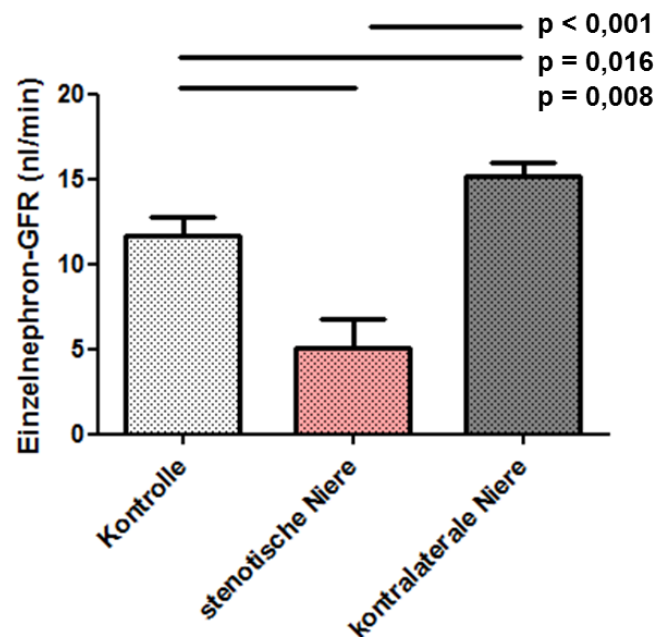
**Abbildung 25: glomerulär-kapillärer Blutfluss unter der Therapie mit Losartan** Die Messung des Blutflusses in glomerulären Kapillaren ergab sowohl in der stenotischen als auch in der kontralateralen Niere keine veränderten Werte im Vergleich zur stenotischen und kontralateralen Nieren ohne medikamentöse Beeinflussung.



### 3. Untersuchung weiterer funktioneller Parameter der Niere mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie

#### 3.1. Einzelnephron-GFR

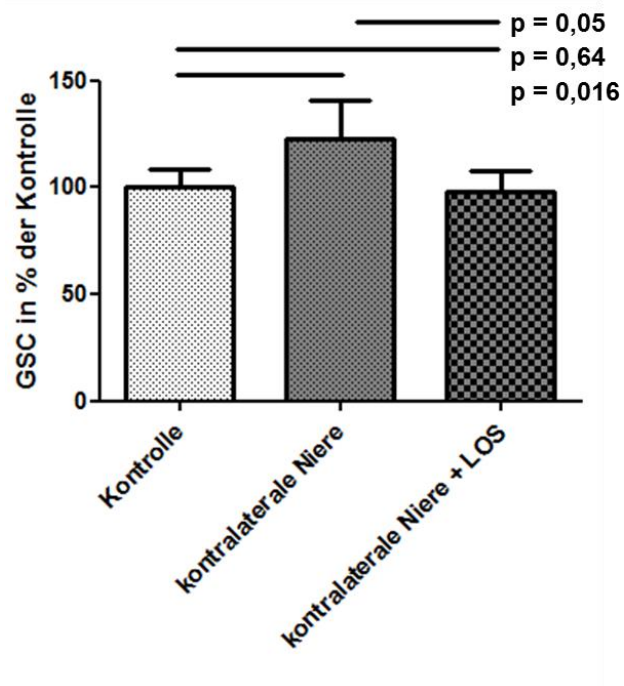
Die Aufrechterhaltung einer stabilen glomerulären Filtrationsrate ist von essentieller Bedeutung für die Funktionsfähigkeit des Nephrons. Auch bei leichten Blutdruckschwankungen wird dies über autoregulatorische Mechanismen wie zum Beispiel myogene Effekte bzw. tubulo-glomeruläre Feedback-Mechanismen unter physiologischen Bedingungen erreicht. In der geklippten Niere konnte die GFR des Einzelnephrons jedoch nicht mehr aufrechterhalten werden ( $5,1 \text{ nl/min} \pm 1,7$   $n=9$  vs.  $11,7 \text{ nl/min} \pm 1,0$  in den Kontrolltieren,  $n=6$ ,  $p<0,001$ ). In der kontralateralen Seite wurde ein Anstieg der Einzelnephron-GFR um ca. 25% verzeichnet ( $15,1 \text{ nl/min} \pm 0,7$   $n=8$  vs.  $11,7 \text{ nl/min} \pm 1,0$   $n=6$ ,  $p=0,016$ ). Dieses Phänomen wird als kompensatorische Hyperfiltration bezeichnet.



**Abbildung 26: Einzelnephron-GFR** In der stenotischen Niere war ein signifikanter Abfall der Einzelnephron-GFR im Vergleich zu Kontrollnieren zu verzeichnen. Im Gegenzug dazu kam es zu einer kompensatorischen Hyperfiltration der kontralateralen Niere.

Zu den Therapiezielen bei Patienten mit unilateraler Nierenarterienstenose zählt die Vermeidung von Endorganschäden in der Niere. In Folge einer Hyperfiltration, wie sie in der kontralateralen Niere vorherrscht ( $15,1 \text{ nl/min} \pm 0,7$   $n=8$ ), kann es zu einem zunehmenden Funktionsverlust der Glomeruli kommen,

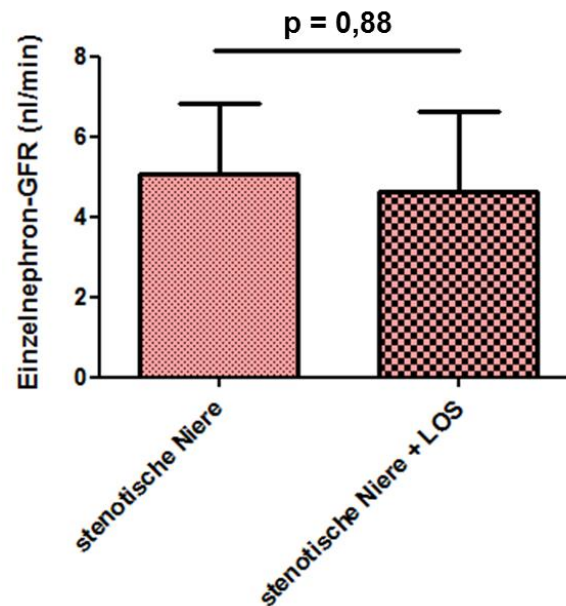
den es therapeutisch zu verhindern gilt. Durch die Behandlung mit Losartan konnte die Einzelnephron-GFR in der kontralateralen Niere ( $12,4 \text{ nl/min} \pm 1,0$ ,  $n=9$ ) auf Kontrollniveau ( $11,7 \text{ nl/min} \pm 1,0$ ,  $n=6$ ,  $p=0,64$ ) gesenkt werden.



**Abbildung 27: Einzelnephron-GFR der kontralateralen Niere** Losartan bewirkte eine signifikante Reduktion der Einzelnephron-GFR in der kontralateralen Niere. Eine Hyperfiltration der kontralateralen Niere konnte vermieden werden, da sich die Werte im Referenzbereich befanden.

Die Einzelnephron-GFR in den stenotischen Nieren zeigte durch die Behandlung keine Unterschiede (stenotische Niere:  $5,1 \pm 1,7 \text{ nl/min}$ ,  $n=9$ , stenotische Niere + LOS  $4,6 \text{ nl/min} \pm 2,0$ ,  $n=8$ ,  $p=0,88$ ).



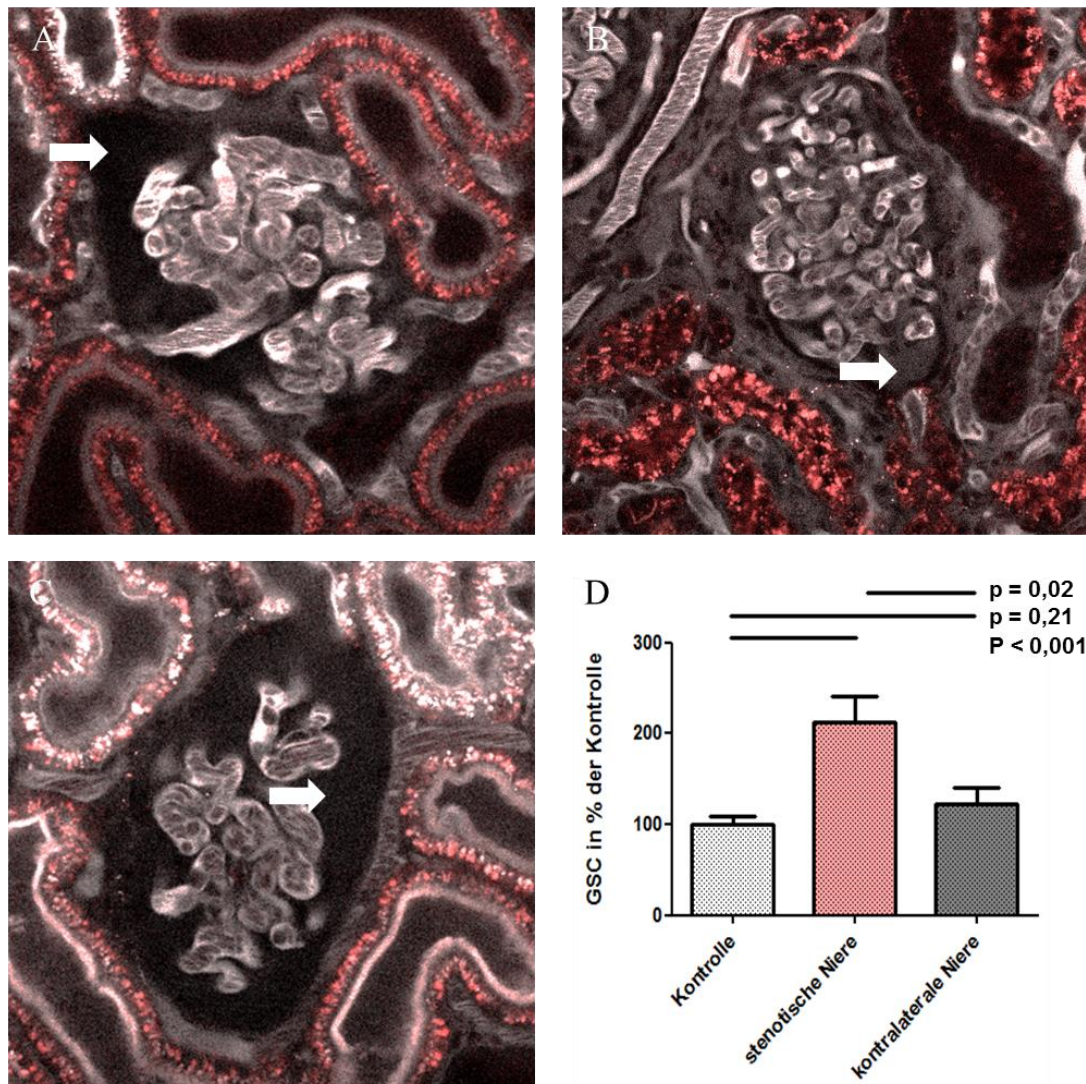


**Abbildung 28: Einzelnephron-GFR der stenotischen Niere** Nach Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors zeigten die stenotischen Nieren behandelter Tiere eine vergleichbar niedrige Einzelnephron-GFR wie die stenotischen Nieren un behandelter Tiere.

### 3.2. GSC<sub>A</sub>

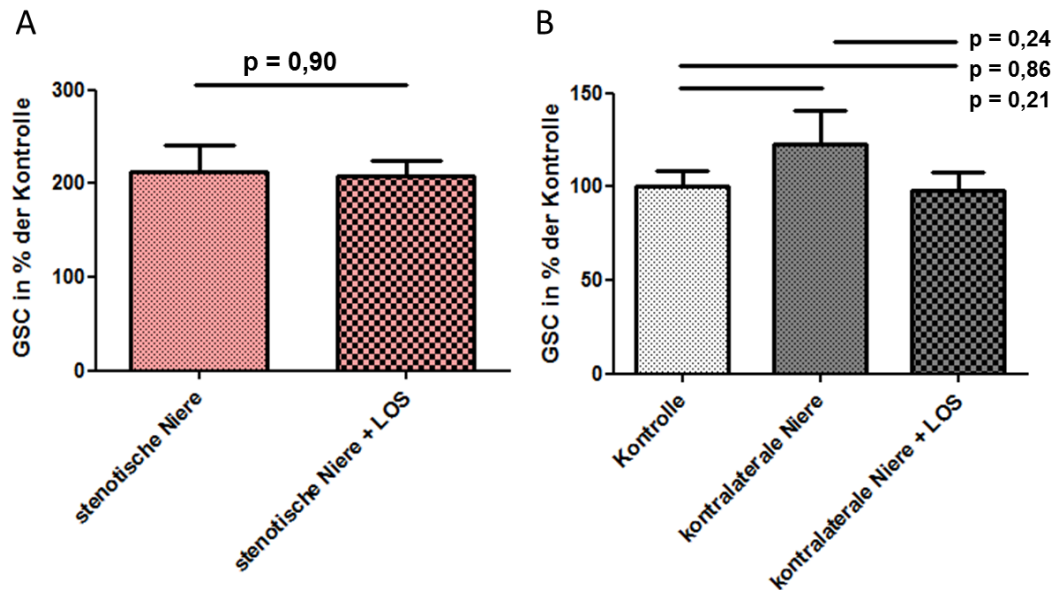
Bei einer einseitigen Nierenarterienstenose kommt es zu einer deutlich veränderten Perfusion der Glomeruli der stenotischen Niere. Auch in der kontralateralen Niere konnten geringfügige Unterschiede registriert werden. Durch Veränderungen im renalen Perfusionsdruck und in der Ang II-Konzentration bei unilateraler Nierenarterienstenose besteht die Hypothese, dass es zu einer Veränderung der Permeabilität der Filtrationsbarriere kommt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der glomeruläre Siebkoeffizient für Albumin in der stenotischen und kontralateralen Niere bestimmt.

In der stenotischen Niere kommt es zu einem deutlichen Verlust der Integrität der Filtrationsbarriere, was sich in einem auf das 2,1-fach erhöhten GSC<sub>A</sub> widerspiegelt (stenotische Niere, n=10, Kontrolle n=7, p=0,036). In der kontralateralen Niere (n=8) kommt es zu einem Anstieg um 22,5% im Vergleich zu Kontrollnieren. Obwohl die Zunahme des GSC<sub>A</sub> nicht signifikant ist (p=0,21), sollte sie dennoch als biologisch relevant eingestuft werden.



**Abbildung 29: Effekte einer einseitigen Nierenarterienstenose auf den GSC<sub>A</sub>** Unter Kontrollbedingungen (A) kommt es nur zu einer äußerst geringen Filtration von FITC-Albumin in den Harnraum (weißer Pfeil). In Glomeruli unter stenotischen Bedingungen (B) wird sichtbar mehr Albumin filtriert und folglich färbt sich der Harnraum grau. Auch in der kontralateralen Niere (C) wird ca. 20% mehr Albumin im Vergleich zur Kontrolle filtriert.

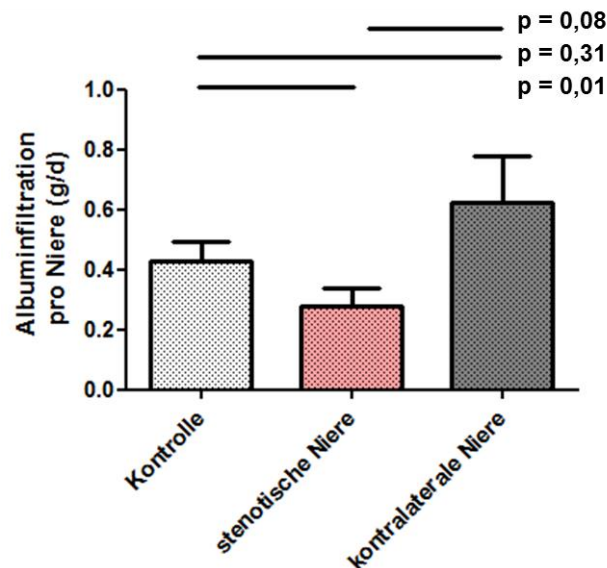
Um den Einfluss von Losartan auf die Integrität der Glomerulären Filtrationsbarriere im akuten Stadium des Goldblatt-Hypertonie-Modells zu untersuchen, wurde erneut der GSC<sub>A</sub> bestimmt. In der behandelten Tiergruppe war der GSC<sub>A</sub> in den Glomeruli der stenotischen Niere vergleichbar mit der unbehandelten Tiergruppe (212% ± 29, n=10 vs. 208% ± 17, n=9, p=0,90). In der kontralateralen Niere zeigte sich ein positiver, wenn auch nicht signifikanter (p=0,24), Effekt auf die Funktionsfähigkeit der Filtrationsbarriere. Der GSC<sub>A</sub> der kontralateralen Niere entsprach nach der Behandlung dem Kontrollniveau (98% ± 10,4, n=9 vs. 100% ± 8, n=7)



**Abbildung 30:** GSC<sub>A</sub> In der stenotischen Niere (A) konnte kein Effekt auf den GSC<sub>A</sub> gemessen werden. In der kontralateralen Niere zeigte sich ein geringgradig niedrigerer GSC<sub>A</sub> (B). Es kam folglich zu einer Stabilisierung der Filtrationsbarriere, sodass der GSC<sub>A</sub> unter der Behandlung mit Losartan im Referenzbereich angesiedelt war.

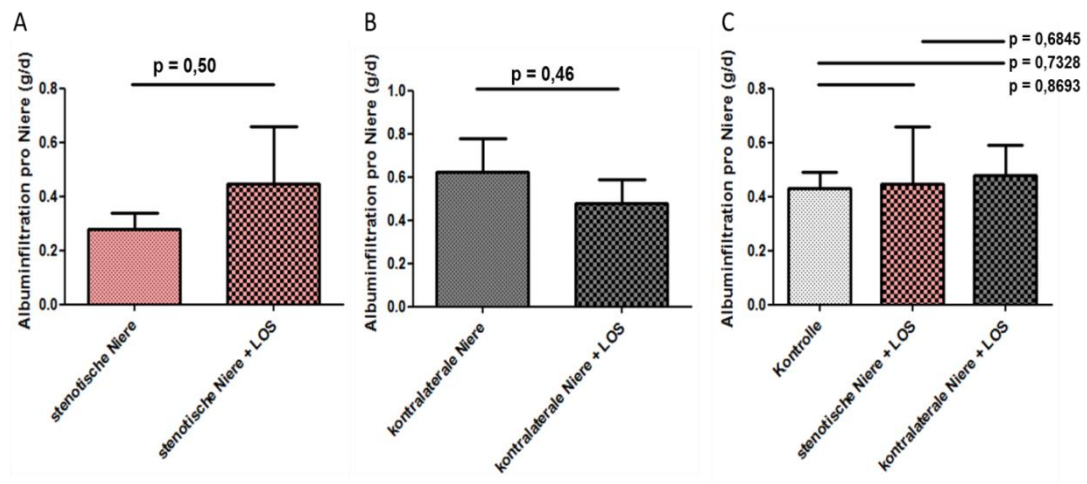
### 3.3. Filtration von Albumin

Um die Veränderungen der Albuminfiltration im 2K1C-Modell zu charakterisieren, wurde sie durch Multiplikation der Einzelnephron-GFR mit dem GSC<sub>A</sub> berechnet. Unter der Annahme, dass eine Rattenniere aus 25 000 Nephronen besteht (Fassi et al., 1998), ergibt sich eine Albuminfiltration pro Niere von  $0,43 \text{ g/d} \pm 0,06$  in Kontrolltieren ( $n=6$ ). In der stenotischen Niere wird trotz eines erhöhten GSC<sub>A</sub> aufgrund der geringen glomerulären Filtrationsrate vergleichsweise wenig Albumin filtrierte ( $0,28 \text{ g/d} \pm 0,06$ ,  $n=9$ ,  $p=0,11$ ). In der kontralateralen Niere wird hingegen mehr Albumin filtrierte ( $0,62 \text{ g/d} \pm 0,2$ ,  $n=7$ ,  $p=0,31$ ). Dies kommt durch eine deutlich erhöhte glomeruläre Filtrationsrate und die geringgradig erhöhte Durchlässigkeit der Filtrationsbarriere zustande.



**Abbildung 31: Albuminfiltration im 2K1C-Modell** Im Goldblatt-Hypertonie Modell kam es zu einer deutlich verringerten Albuminfiltration in der geklippten Niere. In der kontralateralen Niere wurde im Mittel jedoch 60% mehr Albumin filtriert als in Kontrolltieren.

Durch die Behandlung mit Losartan konnten weder in der stenotischen (stenotische Niere + LOS  $0,45 \text{ g/d} \pm 0,2$ ,  $n=8$  vs. stenotische Niere  $0,28 \pm 0,06$ ,  $n=9$ ,  $p=0,50$ ) noch in der kontralateralen Niere (kontralaterale Niere + LOS  $0,48 \pm 0,1$ ,  $n=9$  vs. kontralaterale Niere  $0,62 \pm 0,2$ ,  $n=7$ ,  $p=0,46$ ) signifikante Effekte auf die Albuminfiltration erzielt werden. Vergleicht man jedoch die Messergebnisse der behandelten Nieren mit den Kontrollnieren, so wird deutlich, dass die ohne Behandlung bestehenden signifikanten Unterschiede nicht mehr vorhanden sind. In der stenotischen Niere kommt dies dadurch zustande, dass der  $\text{GSC}_A$  auch unter Behandlung auf sehr hohem Niveau bleibt und die Einzelnephron-GFR geringgradig zugenommen hat. In der kontralateralen Niere ergibt sich insgesamt ein leichter Rückgang der Albuminfiltration aufgrund einer normalisierten Einzelnephron-GFR im Zusammenspiel mit einem leichten Rückgang des  $\text{GSC}_A$ . Folglich konnte durch die Therapie mit Losartan zwar kein signifikanter, jedoch ein biologisch relevanter Effekt auf die Albuminfiltration erzielt werden.



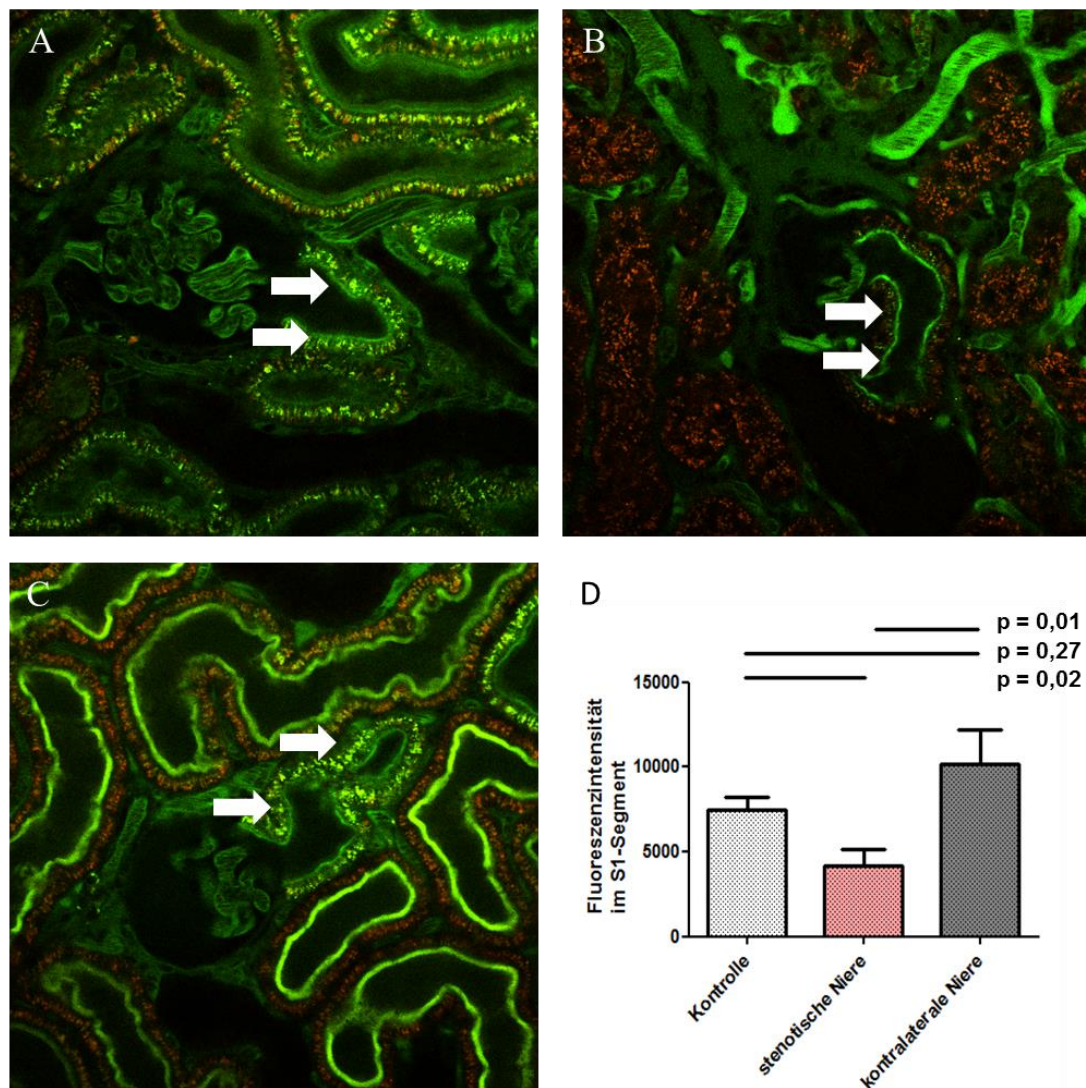
**Abbildung 32: Albuminfiltration unter  $AT_1$ -Rezeptor Blockade im 2K1C-Modell**

Die Albuminfiltration in der stenotischen (A) und kontralateralen Niere (B) zeigt durch Losartan keine signifikanten Veränderungen. Unter Losartan Behandlung ist jedoch sowohl die Albuminfiltration der stenotischen als auch der kontralateralen Niere mit Kontrollnieren vergleichbar (C), was als biologisch relevanter Effekt eingestuft wird.

### 3.4. Albuminrückresorption im S1-Segment des proximalen Tubulus

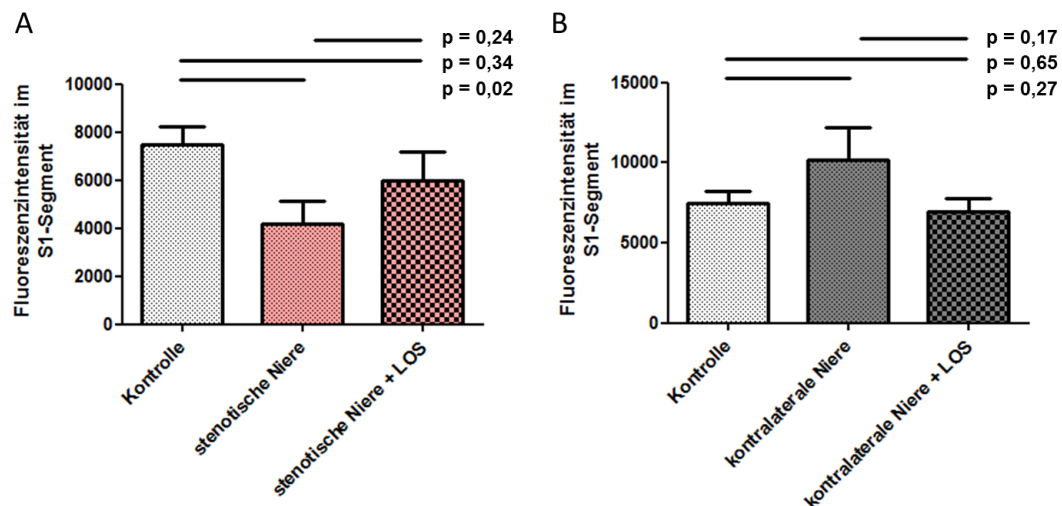
Die Rückresorption von Albumin im Anfangsabschnitt des proximalen Tubulus wurde als Zunahme der Fluoreszenzintensität nach FITC-Albumin im Vergleich zur Basalaufnahme gemessen. In den Kontrolltieren wurde eine Fluoreszenzintensität von  $7479 \text{ FU} \pm 749$  ( $n=7$ ) gemessen. In der stenotischen Niere wurde durchschnittlich eine Intensität von  $4178 \text{ FU} \pm 1271$  ( $n=9$ ) bzw.  $10210 \text{ FU} \pm 1974$  in der kontralateralen Niere ( $n=9$ ) bestimmt. Die Rückresorption von Albumin nahm folglich in der stenotischen Niere bezogen auf die Kontrolle um 45% ab ( $p=0,02$ ) und in der kontralateralen Niere um 35% ( $p=0,27$ ) zu.





**Abbildung 33: Rückresorption von Albumin im S1-Segment des proximalen Tubulus** Unter Kontrollbedingungen (A) kam es zu einer mäßigen Rückresorption von Albumin im proximalen Tubulus. Verglichen mit der Kontrolle wurde in der stenotischen Niere (B) deutlich weniger rückresorbiert. Im Gegensatz dazu war die Rückresorption in der kontralateralen Niere (C) um etwa 35% erhöht. D: Auswertung der Fluoreszenzintensitäten von FITC-Albumin im S1-Segment als Maß für die Rückresorption

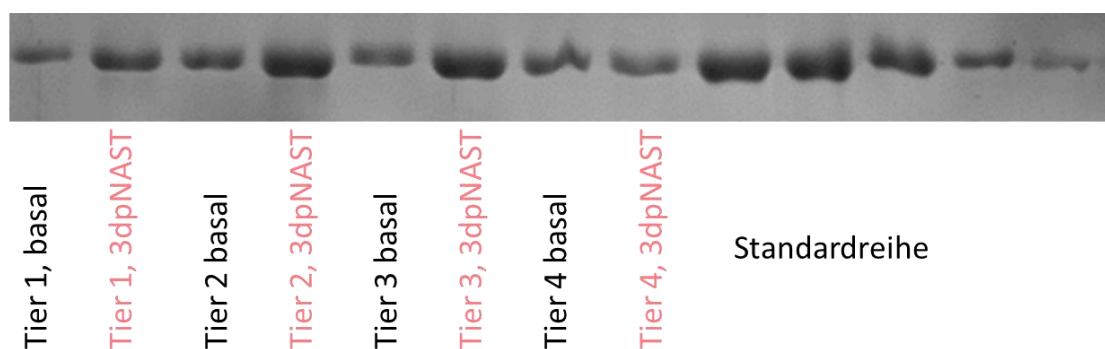
Die Fluoreszenzintensität im S1-Segment als Maß für die Albuminrückresorptionsleistung wurde auf gleiche Weise in der stenotischen und kontralateralen Niere in Losartan behandelten Tieren untersucht. Die ohne Behandlung vorliegenden Unterschiede in der Fähigkeit des proximalen Tubulus zur Rückresorption von Albumin waren nach der Behandlung nicht mehr ersichtlich. In der stenotischen Niere + LOS wurde eine Fluoreszenzintensität von  $6001 \text{ FU} \pm 1165$  ( $n=9$ ) gemessen. Sie war mit der Intensität in Kontrolltieren vergleichbar ( $p=0,34$ ). Auch in der kontralateralen Niere ( $6957 \pm 806$ ,  $n=8$ ) war die Fluoreszenzintensität auf Kontrollniveau ( $p=0,65$ ).



**Abbildung 34: Albuminrückresorption im S1-Segment unter der Therapie mit Losartan** Sowohl in der stenotischen (A) als auch in der kontralateralen Niere (B) zeigte sich unter Losartanbehandlung eine normale Albuminrückresorption verglichen mit Kontrollnieren.

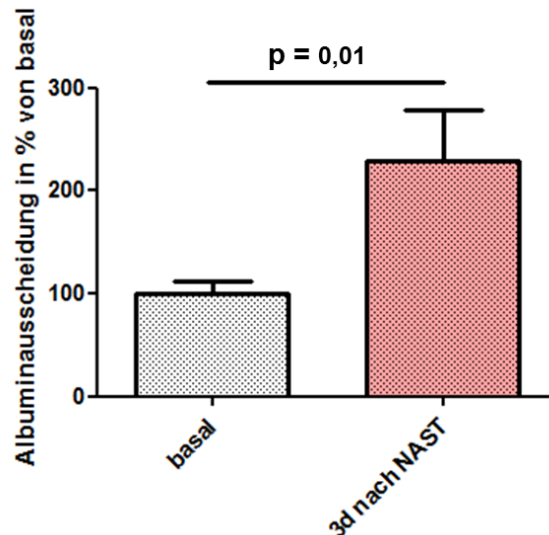
### 3.5. Albuminausscheidung im Urin

Um den akuten Effekt der renovaskulären Hypertonie auf die Albuminausscheidung im Urin zu quantifizieren, wurde der Albumin-Osmolalitäts-Quotient in Spontanurinproben bestimmt. Der Urin wurde vor der Behandlung und drei Tage nach Implantation des Stenoseklips gesammelt und anhand eines Coomassie-gefärbten SDS-PAGE Gels densitometrisch analysiert.



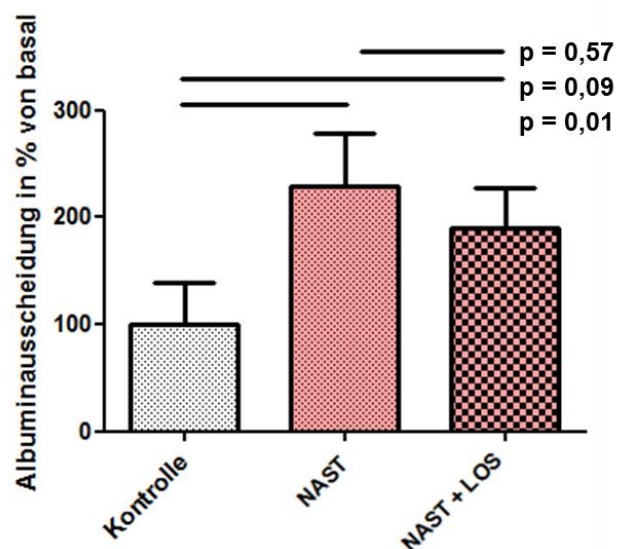
**Abbildung 35: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel** mit basal bzw. drei Tage nach Nierenarterienstenose gewonnenen Urinproben. Der Albumin Standard ist in folgenden Konzentrationen aufgetragen: 2, 1,5, 1,0, 0,5 und 0,25 µg/µl.

Der Albumin-Osmolalitäts-Quotient wurde auf den Basalwert des jeweiligen Tieres bezogen. Es ergab sich eine 2,3-fach erhöhte Albuminausscheidung drei Tage nach Beginn der Stenose.



**Abbildung 36: Quantitative Analyse der Albuminausscheidung im Urin** Das in Abbildung 35 dargestellte SDS-Page-Gel wurde im Anschluss densitometrisch vermessen. Der Albumin-Osmolalitäts-Quotient stieg aufgrund der Stenose signifikant an.

Auch unter der Hypertoniebehandlung mit Losartan wurde die Albuminausscheidung quantifiziert. Es konnte eine Reduktion der Albuminausscheidung über den Urin um ca. 20% erzielt werden (NAST 230%  $\pm$  48 vs. NAST+LOS 190%  $\pm$  37,  $n=0,57$ ). Verglichen mit der basalen Ausscheidung war die Albuminausscheidung 1,9-fach erhöht. Dies war jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 37: Albuminausscheidung unter Losartanbehandlung** Durch die Behandlung mit Losartan war in Tieren mit einer unilateralen Nierenarterienstenose die Albuminausscheidung nur noch 1,9-fach erhöht, was einer Reduktion um ca. 20% entspricht.



### **3.6. Aus welcher Niere kommt das Albumin im Urin?**

Um die Fragestellung zu klären aus welcher der beiden Nieren das Albumin kommt, welches im Urin von Tieren mit Nierenarterienstenose zu finden ist, wurde die Albuminausscheidung näherungsweise mathematisch aus den erhobenen Daten für die Albuminfiltration und Rückresorption berechnet. Dazu wurde die Albuminfiltration und -rückresorption in den Kontrolltieren gleich 100% gesetzt und mit den Ergebnissen in der stenotischen und kontralateralen Seite verglichen.

In der Kontrollniere kommt es zu einer nahezu vollständigen Rückresorption von filtriertem Albumin, da annähernd kein Albumin über den Urin ausgeschieden wird. In der stenotischen Niere hingegen ist die Rückresorptionsleistung des S1-Segments des proximalen Tubulus nicht ausreichend um die gesamte filtrierte Menge an Albumin wieder aufzunehmen. Die berechnete Albuminfiltration in den Glomeruli der stenotischen Niere betrug 65% der Albuminfiltration in Kontrolltieren. Die Fluoreszenzintensität des FITC-Albumin im S1-Segmente, welche mit dem Albumin-Uptake in dieser Region korreliert, war im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich geringer (56%).

In der kontralateralen Niere reicht die Resorptionskapazität (136%) nicht aus, um die vergrößerte Menge an filtriertem Albumin (144%) zu absorbieren.

Es wurde demnach durch näherungsweise Berechnung der Albuminausscheidung geschlussfolgert, dass das Albumin, das im Urin erscheint, zu gleichen Teilen aus beiden Nieren stammt. Beiden Nieren scheinen somit an der Entstehung einer Albuminurie im Goldblatt-Hypertonie Modell beteiligt zu sein.

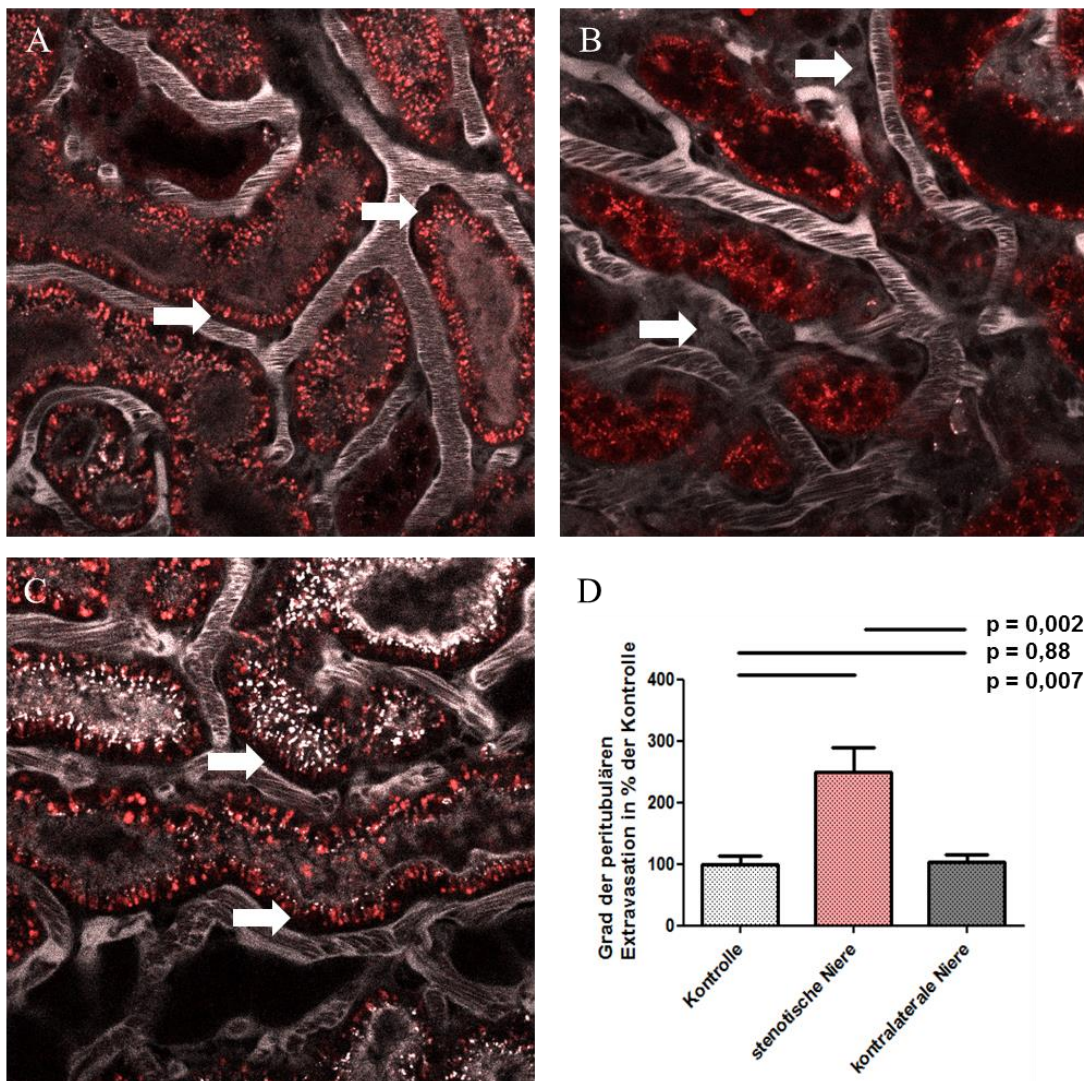
Unter der Behandlung mit Losartan normalisierte sich die Albuminfiltration und -rückresorption, sodass beide Parameter Kontrollniveau erreichten (siehe IV.3.3. und IV.3.4.). Mit Hilfe des SDS-PAGE Gels wurde jedoch eine 1,9-fach erhöhte Albuminausscheidung im Urin gemessen (siehe IV.3.5.) Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass die Albuminausscheidung unter der Behandlung mit Losartan bei normaler Rückresorption geringfügig (n.s.) erhöht war.

Durch die Behandlung mit Losartan verbesserte sich die Rückresorption in der stenotischen Seite. Jedoch blieb sie leicht unter dem Kontrollwert (n.s.), wohingegen die Albuminfiltration normal war. So kam es trotz der Behandlung zu

einer vermehrten Albuminausscheidung, wenn auch in geringerem Maße. Wiederum waren beide Nieren an dem gesteigerten Albuminverlust beteiligt.

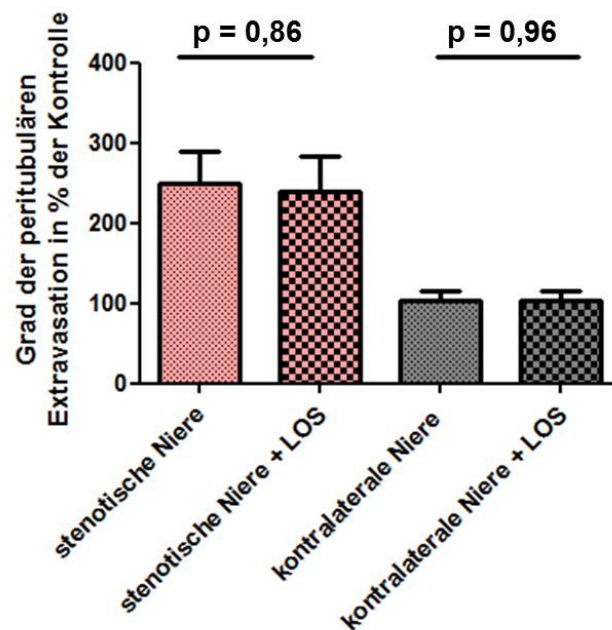
### 3.4. Permeabilität peritubulärer Gefäße

Nierenerkrankungen, die mit einer verringerten Perfusion des Gewebes einhergehen, zeigen häufig eine erhöhte Permeabilität der Gefäße. Die Folge davon ist eine Ödembildung durch Extravasation in das umliegende Gewebe. Um den Effekt der reduzierten Durchblutung, wie sie in der stenotischen Niere vorherrscht, zu untersuchen, wurde der Grad der peritubulären Extravasation von FITC-Albumin bestimmt. Im Vergleich zu Kontrolltieren (n=6) ist die Extravasation von FITC Albumin in der stenotischen Niere (n=8) 2,5-fach erhöht. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Permeabilität der peritubulären Kapillaren der stenotischen Niere erheblich gesteigert war. Die kontralaterale Seite (n=8) war in diesem Parameter unverändert.



**Abbildung 38: peritubuläre Extravasation von FITC-Albumin in das Interstitium** In der Kontrollniere (A) und in der stenotischen Niere (C) wurde kaum eine Freisetzung von FITC-Albumin aus den peritubulären Gefäßen in das angrenzende Interstitium beobachtet. Das Interstitium erscheint ungefärbt (weiße Pfeile in A/C). In der stenotischen Niere (C) kam es zu einer deutlichen Extravasation von FITC-Albumin. Das Interstitium erschien grau (weißer Pfeil). D: Quantifizierung der Extravasation in peritubuläres Nachbargewebe

Auch unter Losartan wurde in der stenotischen Niere eine deutlich gesteigerte Extravasation von Plasmabestandteilen beobachtet (stenotische Niere + LOS  $240\% \pm 44$ ,  $n=9$  vs. stenotische Niere  $250\% \pm 38$ ,  $n=8$ ,  $p=0,86$ ). In der kontralateralen Niere blieb die Permeabilität der Gefäße durch die Behandlung ebenfalls unbeeinflusst (kontralaterale Niere + LOS  $104\% \pm 11,6$ ,  $n=9$  vs. kontralaterale Niere  $103\% \pm 12$ ,  $n=8$ ,  $p=0,96$ ). Den Ergebnissen zur Folge hat eine Blockade des  $AT_1$ -Rezeptors im Goldblatt-Hypertonie-Modell keinen Einfluss auf die Durchlässigkeit der peritubulären Kapillaren.



**Abbildung 39: Grad der peritubulären Extravasation von FITC Albumin in das Interstitium unter Losartanbehandlung** Durch die Behandlung mit Losartan konnte kein Effekt auf den Grad der Extravasation in der stenotischen und kontralateralen Niere erzielt werden.

## **VI. DISKUSSION**

In der vorliegenden Arbeit sollten in einem *in vivo* Modell der unilateralen Nierenarterienstenose die Nierenfunktion und die therapeutischen Effekte des AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten Losartan untersucht werden. Mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie war es möglich, die Effekte einer einseitigen Stenose auf beide Nieren darzustellen. Verglichen mit anderen Methoden wie histologischen Untersuchungstechniken oder der Mikropunktion erlaubte diese minimal invasive Technik die zeitgleiche Visualisierung der Struktur und Funktion beider Nieren. Diese Untersuchungstechnik wurde gewählt, um die Zusammenhänge zwischen einem systemischen Blutdruckanstieg, hämodynamischen Veränderungen in der Niere und deren funktionellem Einfluss auf die Filtration der Niere besser zu verstehen.

Als Tiermodell dienten MWF/W Ratten. Sie wurden durch Kreuzung von MWF und Wistar Ratten erzeugt. Da sie eine ausreichend große Anzahl oberflächlicher Glomeruli zeigten, waren sie ähnlich gut wie MWF Ratten für die Intravitalmikroskopie geeignet. MWF Ratten, die oft für intravitale Untersuchungen eingesetzt werden, entwickeln mit zunehmendem Alter glomerulosklerotische Läsionen, eine Proteinurie und Hypertonie (Hackbarth et al., 1991). Im Gegensatz zu MWF Ratten zeigten MWF/W Ratten signifikant weniger glomerulosklerotische Läsionen, eine geringere Proteinausscheidung im Harn und einen niedrigeren arteriellen Blutdruck.

MWF/W Ratten stellen deshalb ein geeignetes physiologisches Tiermodell zur Untersuchung der glomerulären Funktion mit Hilfe der Intravitalmikroskopie dar.

### **1. Auswirkungen einer unilateralen Nierenarterienstenose auf den systemischen Blutdruck**

Bereits 1934 wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Minderperfusion einer Niere Auswirkungen auf den systemischen Blutdruck hat (Goldblatt et al., 1934). In Folgestudien stellte sich heraus, dass eine hämodynamisch relevante Lumenverengung der A. renalis vor allem über die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zu einer arteriellen Hypertonie führt (Skeggs et al., 1976). Die Behandlung der arteriellen Hypertonie und ihrer

Folgeerscheinungen steht im Fokus der therapeutischen Intervention bei einer Nierenarterienstenose. Bei Patienten, die keinen weiteren Risikofaktoren ausgesetzt sind, wird eine Normalisierung des Blutdrucks auf <140 mmHg systolisch und <90 mmHg diastolisch angestrebt. Leiden die Patienten zusätzlich unter einem Diabetes mellitus oder einer chronischen Nierenerkrankung, sollten systolische Werte zwischen 130-139 mmHg und diastolische zwischen 80-85 mmHg das Ziel der Behandlung sein. Bei einer schwerwiegenden Proteinurie sind systolische Blutdruckwert unter 125 mmHg und 75 mmHg diastolisch erstrebenswert (Wagner and Fischereider, 2011).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in MWF/W Ratten durch Erzeugung einer unilateralen Nierenarterienstenose mit Hilfe eines Silberklips ein deutlicher Blutdruckanstieg nachvollzogen werden. Der systolische Blutdruck, der mit der Tail-Cuff Methode am wachen Versuchstier gemessen wurde, war im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich erhöht. Auch der mittlere arterielle Blutdruck, der in anästhesierten Versuchstieren ermittelt wurde, verzeichnete im Vergleich zu Kontrolltieren einen Anstieg. Insgesamt lagen die Absolutwerte für den arteriellen Blutdruck, aufgrund von bekannten kardiodepressiven Effekten des verwendeten Narkosemittels Isofluran, auf einem niedrigerem Niveau (Merin, 1977).

Aus den Ergebnissen der Blutdruckmessungen wurde geschlussfolgert, dass dieses Modell geeignet ist, die akuten Effekte einer unilateralen Nierenarterienstenose mit renovaskulärer Hypertonie zu untersuchen.

Zur Standardtherapie einer unilateralen Nierenarterienstenose gehören Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (European Stroke et al., 2011). Am häufigsten werden ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker eingesetzt, wobei die genauen Wirkungsmechanismen bislang nicht umfassend aufgeklärt werden konnten. Es wurde jedoch die Hypothese aufgestellt, dass durch Inhibition des RAAS hämodynamische und nicht-hämodynamische Effekte von Angiotensin II beeinflusst werden (Taal and Brenner, 2000, Remuzzi et al., 2005).

Nach aktuellem Wissensstand ist nicht geklärt, ob ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptor-Blocker das Mittel der Wahl in der Hypertonietherapie sind. Unter der Behandlung mit ACE-Hemmern kommt es deutlich häufiger zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Reizhusten und angioneurotischen Ödemen (Müller-Oerlinghausen et al., 1999). Aufgrund der geringeren Nebenwirkungen

wird die Therapie mit AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockern besser toleriert und nur sehr selten (2,3% der Fälle) abgebrochen (Klütting, 1997). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Inhibitoren aufgrund der vermehrten Angiotensin II-Wirkung am AT<sub>2</sub>-Rezeptor einen therapeutischen Vorteil gegenüber ACE-Hemmern haben könnten (Schiessl and Castrop, 2013, Siragy, 2009).

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte von Losartan im 2K1C-Hypertonie-Modell untersucht. Mit Losartan wurden gute blutdrucksenkende Effekte in Tieren mit unilateraler Nierenarterienstenose erzielt. Sowohl der systolische als auch der mittlere arterielle Blutdruck konnten durch die Behandlung signifikant gesenkt werden. Wie zu erwarten war, hatte Losartan auch in scheinoperierten Kontrolltieren einen blutdrucksenkenden Effekt. In Kontrolltieren wurde der Blutdruck durch Losartan um durchschnittlich 9 mmHg gesenkt.

## **2. Akute Effekte einer unilateralen Nierenarterienstenose auf die Durchblutung der Niere**

Um eine normale Nierenfunktion aufrechtzuerhalten, ist eine adäquate Durchblutung essentiell. 20% des Herzminutenvolumens dienen bei Säugetieren der Durchblutung der Nieren. Die Nierendurchblutung wird durch autoregulatorische Mechanismen (Bayliss-Effekt und tubuloglomerulärer Feedback-Mechanismus) im autoregulatorischen Druckbereich zwischen 80 und 170 mmHg relativ konstant gehalten. Auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System spielt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Erst wenn der autoregulatorische Bereich des Blutdrucks verlassen wird, führt dies zu einer Veränderung des renalen Blutflusses. Die großzügige Blutversorgung der Niere ist nicht primär notwendig um die metabolische Versorgung der Niere zu gewährleisten, sondern dient der Aufrechterhaltung der glomerulären Filtration (Schnermann and Sayegh, 1998).

In einer Vielzahl von Studien wurde versucht, den Einfluss einer einseitigen Nierenarterienstenose auf die Blutversorgung der geklippten und der kontralateralen Niere zu untersuchen. Murphy et al. stellten fest, dass bei einem Klipdurchmesser von 0,2 mm ein Blutdruckgradient über der Stenose von ca. 50 mmHg herrscht (Murphy et al., 1984). Diagnostisch gelten bereits Druckgradienten von >15 mmHg als hämodynamisch relevant (Kribben et al., 1998).

Ob der Perfusionsdruck in der Nierenarterie distal der Stenose verändert ist, ist umstritten. Einige Studien postulieren einen normalen Druck (Schwietzer and Gertz, 1979, Murphy et al., 1984, Bounous and Shumacker, 1962), andere wiederum registrierten einen erniedrigten Blutdruck (Lupu and Maxwell, 1972).

Neben dem Perfusionsdruck war auch der renale Blutfluss in der Nierenarterie das Ziel mehrerer Untersuchungen. Iversen et al. berichteten einen signifikant verminderten Blutflusses in der stenotischen und in der kontralateralen Niere im 2K1C-Modell verglichen mit Kontrolltieren. Die Messungen wurden mit Hilfe einer Flowprobe an der A. renalis zehn Wochen nach Induktion der Stenose durchgeführt (Iversen et al., 1986). Bivol et al. hingegen fanden einen leicht erhöhten Blutfluss in der kontralateralen Niere verglichen mit Kontrollnieren ( $10,0 \pm 1,1$  ml/min vs.  $8,6 \pm 0,7$  ml/min) nach sechs Wochen andauernder Stenose (Bivol et al., 2005). In einem chronischen renovaskulären Hypertonie-Modell wurde in der stenotischen Nierenarterie ein deutlich verringerter Blutfluss im Vergleich zur kontralateralen Nierenarterie gemessen (Miyajima et al., 2005).

In vorangegangenen Studien wurde lediglich die Durchblutung in der Nierenarterie untersucht, jedoch nicht die Durchblutung der nachgeschalteten glomerulären und peritubulären Kapillaren. Um die Zusammenhänge zwischen dem systemischen Blutdruck und den Durchblutungsverhältnissen in den Kapillaren der Niere besser zu verstehen, ist die Messung des kapillären Blutflusses essentiell. Von besonderem Interesse ist die Durchblutung in den glomerulären Kapillaren, da ein erhöhter Perfusionsdruck in den glomerulären Kapillaren Ursache glomerulärer Schädigung sein kann. Dieses Phänomen wurde am Beispiel der diabetischen Nephropathie hinreichend untersucht (Schnermann and Sayegh, 1998).

Um genauer zu überprüfen, ob das glomeruläre und peritubuläre Kapillarbett von der veränderten Durchblutungssituation in der Nierenarterie betroffen sind, wurden der Blutfluss und die Blutflussgeschwindigkeit in glomerulären und peritubulären Kapillaren mittels Multiphotonen-Mikroskopie untersucht.

Im Vergleich zu Kontrolltieren, war sowohl der glomeruläre (-54%) als auch der peritubuläre Kapillarfluss (-40%) in der stenotischen Niere verringert. Die Blutflussgeschwindigkeit in der stenotischen Niere war in ähnlichem Maße reduziert. Dies weist darauf hin, dass trotz der Erhöhung des systemischen Blutdrucks keine adäquate Durchblutung der stenotischen Niere gewährleistet

werden kann.

In der kontralateralen Niere kam es zu einem Anstieg der Blutflussgeschwindigkeit und des Blutflusses um ca. 20%. Wenngleich sich kein signifikanter Unterschied in der Durchblutung verglichen mit Kontrolltieren zeigt, wird jedoch deutlich, dass auch in der kontralateralen Niere die Durchblutung verändert ist.

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich in Studien, die an Diabetes Patienten durchgeführt wurden. Patienten, bei denen eine Hyperfiltration nachgewiesen wurde, die als Wegbereiter glomerulärer Schädigung gilt, zeigten zugleich einen Anstieg des Kapillardrucks in den Glomeruli um ca. 20% (Skrtic et al., 2015, Magee et al., 2009).

Durch die Behandlung mit Losartan konnte weder in der stenotischen noch in der kontralateralen Niere ein signifikanter Effekt auf den Blutfluss erzielt werden.

### **3. Akute Effekte einer unilateralen Nierenarterienstenose auf die Albuminfiltration**

Um die akuten Effekte einer einseitigen Nierenarterienstenose auf die Albuminfiltration zu untersuchen, wurden zunächst die Einzelnephron-GFR und der glomeruläre Siebkoeffizient von Albumin bestimmt um daraus die Albuminfiltration zu berechnen. Des Weiteren sollte geklärt werden ob sich bei einer unilateralen Nierenarterienstenose bereits im Anfangsstadium eine Proteinurie manifestiert und ob diese glomerulären oder tubulären Ursprungs ist.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob eine Behandlung mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten Losartan positive Effekte auf die oben genannten Parameter in diesem Modell der renovaskulären Hypertonie hat.

#### **3.1. Akute Effekte einer Nierenarterienstenose auf die Einzelnephron-GFR**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Minderperfusion einer Niere mit einer Reduktion der glomerulären Filtrationsleistung einhergeht.

Durch den Druckabfall proximal des Stenoseklips ist die renale Durchblutung und der Filtrationsdruck stark eingeschränkt. Dies führt zu einer vermehrten Freisetzung neurohormonaler Faktoren wie Angiotensin II und NO, die auch in



der kontralateralen Niere wirksam werden. Systemisch kommt es, wie bereits beschrieben wurde, zu einem Anstieg des systemischen Blutdrucks, der den Blutdruckabfall in der Niere ausgleichen soll. Obwohl diese gegenregulatorische Mechanismen aktiviert werden, können lediglich 30% der Einzelnephron-GFR aufrechterhalten werden.

In der kontralateralen Niere hingegen kommt es zu einem signifikanten Anstieg der glomerulären Filtration. Dieses Phänomen wird als Hyperfiltration bezeichnet und beschreibt einen Anstieg der GFR über  $135 \text{ ml/min/1,73 m}^2$  (Yang et al., 2013). Die Einwirkung vasokonstriktorischer Faktoren (ANG II) an der efferenten Arteriole und vasodilatatorischer Faktoren an der afferenten Arteriole (NO) führen zu einer glomerulären Hypertension und einem Anstieg der glomerulären Filtration (Skrtic et al., 2015).

Physiologisch tritt eine Hyperfiltration während der Schwangerschaft und nach proteinreichen Mahlzeiten auf (Helal et al., 2012). Das Phänomen der Hyperfiltration ist jedoch vor allem im frühen Stadium eines Diabetes mellitus Typ 1 beschrieben und ist mit einem gesteigerten intraglomerulären Druck, Albuminurie und einer fortschreitenden Nephropathie assoziiert (Magee et al., 2009). Zeigen Patienten zu Beginn ihrer diabetischen Erkrankung eine renale Hyperfiltration, haben sie ein höheres Risiko eine diabetische Nephropathie, die mit einem rapiden Abfall der GFR einhergeht, zu entwickeln (Bjornstad et al., 2015).

Der akute Anstieg der GFR in der kontralateralen Niere konnte durch die Behandlung mit dem  $\text{AT}_1$ -Rezeptorblocker Losartan auf Kontrollniveau zurückgeführt wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass Losartan einen direkten Einfluss auf die GFR nimmt.

In der stenotischen Niere konnte durch Losartan kein Effekt auf die Einzelnephron-GFR erzielt werden. Sie blieb auf unverändert niedrigem Niveau. Eine mögliche Erklärung ist, dass der deutlich verminderte Zufluss zur stenotischen Niere über die A. renalis, der sich in einem verminderten Blutfluss in den glomerulären Kapillaren widerspiegelt, nicht durch die  $\text{AT}_1$ -Rezeptorblockade beeinflusst werden konnte. Folglich wurde kein Effekt auf den effektiven Filtrationsdruck und die glomeruläre Filtrationsrate erzielt.

### **3.2. Effekte auf den glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin**

In der Literatur wird beschrieben, dass die glomeruläre Filtrationsrate Einfluss auf den glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin nimmt. Der  $GSC_A$  steht für die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere.

Über die Art und das Ausmaß dieser Beeinflussung wird jedoch kontrovers diskutiert. Ohlson et al. berichten aus Experimenten an der isoliert perfundierten Niere, dass bei einem Anstieg der GFR auch der glomeruläre Siebkoeffizient von Albumin ansteigt (Ohlson et al., 2001). Nach dem „zwei-Poren-Modell“ wird ein erhöhter glomerulär-kapillärer Druck verantwortlich dafür gemacht, dass vermehrt größere Poren in der Filtrationsbarriere entstehen. Diese Poren ermöglichen es, dass Albumin die Filtrationsbarriere passieren kann (Rippe and Haraldsson, 1994, Johnsson et al., 1994). Lund et al. hingegen beschreiben einen Anstieg des  $GSC_A$  bei verringerter GFR. Bei einer verringerten GFR trägt die Diffusion in vermehrtem Maße zum Transport von Albumin über die Filtrationsbarriere bei (Lund et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde in der stenotischen Niere bei deutlich verminderter GFR ein Anstieg des  $GSC_A$  beobachtet. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der von Lund et al. aufgestellten Hypothese. Ein Abfall der Einzelnephron-GFR auf 30% führte in diesem Modell zu einer Zunahme des  $GSC_A$  auf 212%. Eine Zunahme der Diffusion als treibende Kraft für den Transport von Albumin erscheint plausibel, da aufgrund der herabgesetzten Blutflussgeschwindigkeit in den glomerulären Kapillaren die Kontaktzeit verlängert ist und eine Diffusion begünstigt wird.

In der kontralateralen Seite hingegen ist ein gegenläufiger Effekt zu beobachten. Die Einzelnephron-GFR war um ca. 25% erhöht und ging mit einer ca. 20%-igen Steigerung des  $GSC_A$  einher. Eine erhöhte glomeruläre Filtration führte in der stenotischen Niere, wie es von Ohlson et al. beschrieben wurde, über einen erhöhten Perfusionsdruck zu einer gesteigerten Filtration von Albumin.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beobachtete Veränderung des glomerulären Siebkoeffizienten im Modell der unilateralen Stenose von der GFR abhängig ist. Diese Befunde zeigen deutlich, dass eine adäquate Durchblutung der Niere und eine physiologische GFR eine zentrale Rolle für die Funktionsfähigkeit der Niere spielen.

Durch die Behandlung mit Losartan konnte die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere der stenotischen Niere nicht verbessert werden, da Losartan auch auf den glomerulären Blutfluss und die GFR in der stenotischen Niere keinen Einfluss nahm.

In der kontralateralen Niere konnte die erhöhte Albuminpermeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere durch Losartan gesenkt werden, da auch die beobachtete Hyperfiltration durch die Therapie mit Losartan reduziert wurde.

Diese Befunde unterstreichen die Hypothese, dass der  $GSC_A$  von der GFR abhängig ist.

### **3.3. Albuminfiltration im Two-Kidney-One-Clip-Modell**

Um die Albuminfiltration unter physiologischen Bedingungen zu bestimmen, wurde in Kontrolltieren die Einzelnephron-GFR und der  $GSC_A$  ermittelt und multipliziert. Unter der Annahme, dass sich eine Rattenniere aus 25 000 Nephronen zusammensetzt (Fassi et al., 1998), konnte eine Filtration pro Niere und Tag ermittelt werden.

Verglichen mit Kontrollnieren wurde in der stenotischen Seite deutlich weniger Albumin filtriert. Dies mag zunächst etwas widersprüchlich erscheinen, da der  $GSC_A$  in der stenotischen Niere stark erhöht war. Aufgrund der niedrigen GFR in dieser Niere wurde jedoch insgesamt weniger Albumin filtriert.

In der kontralateralen Niere wurde im Gegensatz zu der stenotischen Niere eine deutlich größere Menge Albumin filtriert. Trotz des nur geringfügigen Anstiegs der glomerulären Permeabilität für Albumin, führte die merklich erhöhte glomeruläre Filtrationsrate zu einem Anstieg der Albuminausscheidung.

Die Behandlung mit Losartan trug sowohl in der stenotischen als auch in der kontralateralen Niere zu einer Normalisierung der Albuminfiltration bei. In der kontralateralen Seite, die im unbehandelten Zustand eine deutliche Hyperfiltration von Albumin (136%) zeigte, blieb die Albuminfiltration jedoch leicht erhöht (112%).

Der  $AT_1$ - Rezeptorblockade kann folglich ein positiver Effekt auf die Albuminfiltration in der kontralateralen Niere zugesprochen werden, da hierdurch die GFR und der  $GSC_A$  auf positive Weise moduliert werden.

#### **4. Akute Effekte einer unilateralen Nierenarterienstenose auf die Albuminrückresorption im proximalen Tubulus**

Obwohl seit Langem bekannt ist, dass die Entwicklung einer Albuminurie entscheidend für den Krankheitsverlauf ist, sind die Schlüsselfaktoren die an der Regulation einer erhöhten Albuminausscheidung beteiligt sind, nicht vollständig geklärt.

Neben der Albuminfiltration beeinflusst auch die Wiederaufnahme von Albumin in den proximalen Tubulus die Albuminausscheidung maßgeblich. Neuere Daten zeigen, dass der proximale Tubulus in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen spielt. Im Besonderen besitzt das S1-Segment sehr effektive Mechanismen zur Reabsorption, Transzytose und Aufarbeitung von filtriertem Albumin (Dickson et al., 2014). Klassischerweise wird die Reabsorption von Albumin durch eine rezeptor-vermittelte Endozytose mittels membran-gebundener Rezeptoren wie Megalin und Cubilin erklärt. Aber auch Mechanismen der Internalisierung wie die Caveolin-abhängige Internalisierung und die fluid-phase Endozytose spielen eine wichtige Rolle (Grant and Donaldson, 2009). Endozytiertes Albumin wird in der Zelle entweder lysosomal degradiert oder gelangt durch Transzytose zurück in die Zirkulation (Racoosin and Swanson, 1993). Der neonatale Fc Rezeptor vermittelt dabei vermutlich eine pH-abhängige Bindung, den intrazellulären Transport und die Selektion zwischen Transzytose und Degradierung (Dickson et al., 2014).

Endozytose von Albumin findet im gesamten proximalen Tubulus statt, jedoch ist sie im S1-Segment am stärksten ausgeprägt (Clapp et al., 1988). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Albuminrückresorption im S1-Segment des proximalen Tubulus mittels Multiphotonen-Mikroskopie quantifiziert. Hierfür wurde die Fluoreszenzintensität des FITC-Albumin ermittelt, das im S1-Segment endozytiert wurde.

In der stenotischen Niere wurde verglichen mit Kontrollnieren signifikant weniger Albumin (56%) rückresorbiert. Obwohl in der stenotischen Niere relativ wenig Albumin filtriert wird (65% im Vergleich zu Kontrolltieren), scheint der proximale Tubulus nicht in der Lage zu sein die filtrierte Menge Albumin vollständig wiederaufzunehmen, sodass Albumin über den Harn verloren geht. Eine mögliche Erklärung für den Funktionsverlust könnte eine ischämische

Schädigung des proximalen Tubulus sein. Die Minderdurchblutung der peritubulären Kapillaren führt zu hypoxischen Stress im Tubulussystem. Da proximale Tubuluszellen funktional größtenteils von aerober ATP Produktion abhängig sind, ist dieser Tubulusabschnitt von einer Hypoxie besonders betroffen (Schiessl et al., 2016, Bagnasco et al., 1985).

In der kontralateralen Niere hingegen wird mehr Albumin rückresorbiert (136%) als in Kontrollnieren. Hauptgrund für eine vermehrte Albumin Endozytose scheint in diesem Fall die signifikant erhöhte Albuminfiltration (144%) zu sein. Jedoch kann auch in der kontralateralen Niere, obwohl endozytotische Mechanismen vermehrt aktiv sind, die filtrierte Menge Albumin nicht vollständig rückresorbiert werden.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Albuminrückresorption in der stenotischen Niere deutlich beeinträchtigt ist. In der kontralateralen Niere ist eine vermehrte Aktivierung endozytotischer Transportwege möglich um die vermehrte Albuminfiltration zumindest teilweise zu kompensieren.

Unter der blutdrucksenkenden Therapie mit Losartan erreichte die Resorptionsleistung des S1-Segments in beiden Nieren den Kontrollbereich.

Trotz der Behandlung mit Losartan war die Albuminfiltration in der kontralateralen Niere geringgradig erhöht, bei normaler Resorptionsleistung im proximalen Tubulus. Das filtrierte Albumin wurde folglich nicht vollständig rückresorbiert.

In der stenotischen Niere war die Albuminfiltration unter Losartanbehandlung auf Kontrollniveau und die Rückresorption erreichte nur den unteren Normbereich, sodass auch in dieser Niere eine leichte Diskrepanz zwischen Filtration und Wiederaufnahme zu erkennen war.

Die Auswirkungen dieser Ergebnisse auf die Albuminausscheidung sollen im Anschluss erläutert werden.

## **5. Akute Effekte einer unilateralen Nierenarterienstenose auf die Albuminausscheidung über den Urin**

Für die Diagnostik von Nierenerkrankungen ist die Bestimmung der Proteinausscheidung und vor allem der des Albumins essentiell. Die Diagnose

einer Proteinurie bzw. Albuminurie dient jedoch nicht nur als rein diagnostischer Marker. Sie kann auch wichtige Hinweise auf den Verlauf einer Krankheit liefern, was sie zu einem wichtigen Indikator für die renale und kardiovaskuläre Prognose macht (Mayer, 2005). Außerdem wird die Verringerung einer Proteinurie durch eine Therapie als Maß für die Effizienz einer Behandlung gesehen. Nach Atkins et al. war eine 50%-ige Abnahme der Proteinurie von einer 50%-igen Verlangsamung der Progression begleitet (Atkins et al., 2005). Bei Patienten mit einem Typ II Diabetes verzweifachte jede Verdoppelung der Proteinausscheidung im Vergleich zum Ausgangswert, das Risiko, eine Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit zu entwickeln (Atkins, 2005)

In der vorliegenden Arbeit wurde unter dem akuten Einfluss einer einseitigen Verengung der A. renalis eine 2,3-fach erhöhte Albuminausscheidung verglichen mit der basalen Albuminausscheidung ermittelt. Diese Ergebnisse untermauern die Veränderungen der Albuminfiltration und -rückresorption, die mittels Multiphotonen-Mikroskopie in der stenotischen und kontralateralen Niere beobachtet wurden.

Die Therapie mit Losartan bewirkte eine Milderung der Albuminurie um ca. 20%. Neben dem deutlich blutdrucksenkenden Effekt kann einer AT<sub>1</sub>-Rezeptorblockade zusätzlich ein positiver Effekt auf die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere und die Funktionsfähigkeit des proximalen Tubulus zugeschrieben werden. Dies resultiert letztendlich in einer verringerten Albuminausscheidung. Nach Atkins et al. ergibt sich daraus auch ein positiver Effekt auf den Verlauf der Erkrankung.

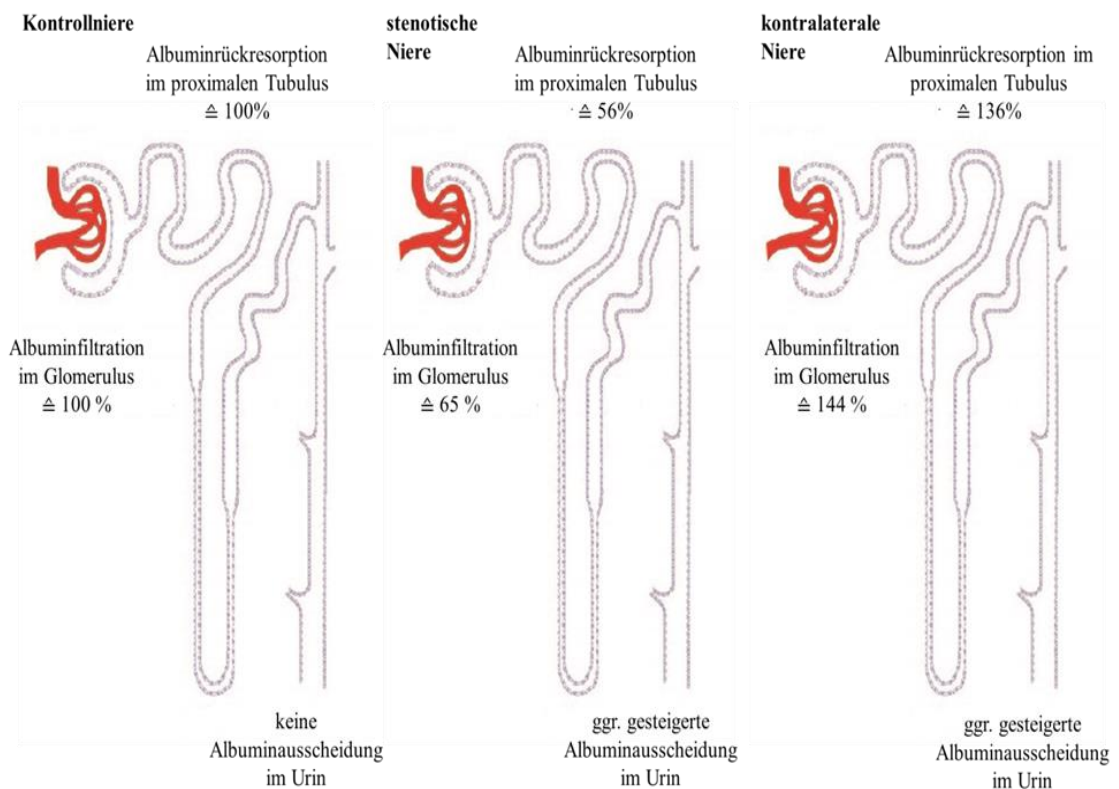
## **6. Identifizierung der Herkunft des Albumins im Urin im Two-Kidney-One-Clip-Modell**

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war es, diejenige Niere zu identifizieren, die im 2K1C-Modell ursächlich an der Entstehung einer Albuminurie beteiligt ist. Um zu ermitteln, ob die stenotische, die kontralaterale Niere oder beide Nieren vermehrt Albumin ausscheiden, wurde die Albuminfiltration- und Rückresorption ermittelt und mit Kontrolltieren verglichen. Es wurde angenommen, dass die mittels Multiphotonenmikroskopie ermittelte Rückresorption von FITC-Albumin in gesunden Kontrolltieren einer Resorptionsleistung von 100 % entspricht. Durch Subtraktion der Rückresorptionsleistung des proximalen Tubulus von der im

Glomerulum filtrierte Albuminmenge lassen sich Rückschlüsse auf die über den Urin ausgeschiedene Menge Albumin ziehen.

Betrachtet man zusammenfassend die Ergebnisse aus V.3. und V.4., so wird deutlich, dass die vermehrte Albuminausscheidung der stenotischen Niere nicht aufgrund einer gesteigerten Albuminfiltration entsteht, sondern durch eine Dysfunktion des proximalen Tubulus. Es handelt sich hierbei folglich um eine tubuläre Proteinurie.

In der kontralateralen Seite hingegen scheint die gesteigerte Albuminfiltration, die offenbar die Rückresorptionsleistung des proximalen Tubulus übersteigt, die Hauptursache einer vermehrten Ausscheidung zu sein. Die kontralaterale Niere entwickelt demzufolge eine glomeruläre Proteinurie.



**Abbildung 40: Schema der Albuminausscheidung der stenotischen und kontralateralen Niere im 2K1C-Modell**

Unter der blutdrucksenkenden Therapie mit Losartan wurde wie bereits beschrieben eine um ca. 20% verminderte Albuminausscheidung ermittelt, die sich folgendermaßen erklären lässt:

In der kontralateralen Niere normalisierte sich die Rückresorptionsleistung des proximalen Tubulus. Die Albuminfiltration war jedoch trotz der Behandlung

geringfügig erhöht. Folglich ergibt sich auch unter Losartenbehandlung eine geringgradig gesteigerte Albuminausscheidung verglichen mit Kontrolltieren.

In der stenotischen Niere war eine leichte Diskrepanz zwischen Albuminfiltration und Wiederaufnahme zu erkennen. Die Albuminfiltration lag auf Kontrollniveau und die Rückresorption erreichte nur den unteren Normbereich. Daraus wurde geschlussfolgert, dass auch die stenotische Niere Albumin über den Urin verliert.

Trotz der Therapie mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker Losartan entwickelte die stenotische Niere eine tubuläre Proteinurie und die kontralaterale Niere eine glomeruläre Proteinurie. Das Ausmaß der Albuminurie konnte durch die Behandlung aber abgeschwächt werden, was die Effizienz der Therapie untermauert und eine günstigere Prognose für den Krankheitsverlauf zulässt.

## **7. Effekte einer unilateralen Nierenarterienstenose auf die Permeabilität peritubulärer Gefäße**

In den letzten Jahren wurde zunehmend erkannt, dass auch postglomeruläre peritubuläre Gefäße eine wichtige Rolle bei der Entstehung eines akuten Nierenversagens spielen (Molitoris, 2005, Molitoris and Sutton, 2004, Ergin et al., 2015). Sowohl eine Sepsis als auch eine Ischämie der Niere beeinflussen die Integrität und Funktion peritubulärer Kapillaren (Molitoris, 2014). Zudem wurde in einem Endotoxämie-Modell ein reduzierter peritubulärer Blutfluss gemessen (Gupta et al., 2007). Der dadurch verursachte tubuläre hypoxische Stress führt zur Freisetzung lokal entzündlicher und profibrotischer Faktoren, die zum Voranschreiten einer Nierenerkrankung beitragen (Matejovic et al., 2016). Auch eine vaskuläre Dysfunktion geht häufig mit einer zunehmenden Permeabilität der Kapillaren und der Bildung von Ödemen einher (Molitoris, 2014).

Auch in der stenotischen Niere wurde ein um 40% verlangsamter Blutfluss in den peritubulären Kapillaren gemessen, der mit einer gesteigerten Permeabilität der Gefäße assoziiert war. Die vermehrte Durchlässigkeit der Kapillaren wurde anhand der vermehrten Extravasation von Plasmaalbumin in das Interstitium sichtbar.

Demzufolge scheint es auch im 2K1C-Modell zu einer Dysfunktion peritubulärer Gefäße in der stenotischen Niere zu kommen, die mutmaßlich am Funktionsverlust der Niere beteiligt sind. Ein möglicher Effekt, der durch die Minder-



durchblutung peritubulärer Gefäße beobachtet wurde, ist der teilweise Funktionsverlust des proximalen Tubulus. Dieser Tubulusabschnitt war nicht mehr in einem adäquaten Umfang zur Rückresorption von Albumin fähig, sodass er auf diese Weise zu einer Albuminurie beiträgt.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

Bei einer unilateralen Nierenarterienstenose führen die Minderperfusion der Niere und die daraus resultierende Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zu einer Vielzahl von ernstzunehmenden Folgeerkrankungen. In den letzten Jahren wurden die Behandlungsmöglichkeiten kontrovers diskutiert und medikamentöse Therapien werden wieder favorisiert. Besonders erfolgreich werden Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems eingesetzt.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente zur Evaluierung der Nierenfunktion nach experimenteller Induktion einer unilateralen Nierenarterienstenose durchgeführt und die Effekte einer AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker-Therapie beleuchtet. Zur simultanen Evaluierung der Nierenfunktion und Morphologie wurden die stenotische und die kontralaterale Niere mit Hilfe der Multiphotonen-Mikroskopie untersucht. Die chirurgische Konstriktion der Nierenarterie durch die Implantation eines Stenoseklips um die A. renalis führte zu einem deutlichen Anstieg des systolischen Blutdrucks, der durch die Behandlung mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten Losartan (200 mg/l Trinkwasser) größtenteils verhindert werden konnte.

Aufgrund einer unilateralen Konstriktion der Nierenarterie war der Blutfluss in den glomerulären und peritubulären Kapillaren der stenotischen Niere verglichen mit scheinoperierten Kontrolltieren deutlich vermindert. Der glomeruläre und peritubuläre Blutfluss der kontralateralen Niere war verglichen mit Kontrollexperimenten um jeweils 25 bzw. 20% erhöht. Eine Therapie mit Losartan nahm keinen Einfluss auf den glomerulären und peritubulären Blutfluss. Die Filtrationsleistung sowie eine intakte glomeruläre Filtrationsbarriere sind essentiell für eine physiologische Nierenfunktion. Aus diesen beiden Parametern kann die Albuminfiltration in der Niere berechnet werden. In klinischen Studien konnte beobachtet werden, dass eine Albuminurie eng mit der Abnahme der Nierenfunktion assoziiert ist. Die Ursache kann in eine vermehrte glomeruläre Filtration und/oder eine inadäquate Albuminrückresorption im proximalen Tubulus sein.

Die glomeruläre Filtrationsleistung der stenotischen Niere war signifikant reduziert, wohingegen in der kontralateralen Niere eine kompensatorische Hyperfiltration festgestellt werden konnte. Diese kann Wegbereiter für

strukturelle und funktionelle Veränderungen der Nieren sein. Die Behandlung mit Losartan erzielte protektive Effekt, indem es die Entwicklung einer Hyperfiltration in der kontralateralen Niere verhinderte. Losartan zeigte jedoch keinen Einfluss auf die glomeruläre Filtrationsleistung der stenotischen Niere.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Filtrationsbarriere des Glomerulums nahezu undurchlässig für hochmolekulare Proteine wie Albumin. Die stenotische Niere zeigte eine deutlich erhöhte Permeabilität der Filtrationsbarriere für Albumin, die durch AT<sub>1</sub>- Rezeptorblockade nicht verbessert werden konnte. Auch in der kontralateralen Niere war die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere eingeschränkt. Jedoch konnte die Behandlung mit Losartan die erhöhte glomeruläre Albuminfiltration reduzieren.

In den untersuchten Tieren mit einer Nierenarterienstenose kam es außerdem zu einer gesteigerten Ausscheidung von Albumin über den Urin. Durch näherungsweise Berechnung der Albuminausscheidung konnte geschlussfolgert werden, dass das ausgeschiedene Albumin zu gleichen Teilen aus der stenotischen und kontralateralen Niere stammt. Die Albuminurie der stenotischen Seite entsteht durch eine tubuläre Dysfunktion, wohingegen sie in der kontralateralen Niere glomerulären Ursprungs ist. Durch die Behandlung mit Losartan wurde die Albuminurie um ca. 20% gemildert.

Im Einklang mit aktuellen klinischen Studien zeigen die vorliegenden Befunde, dass die medikamentöse Hypertoniebehandlung mit einem Angiotensin-Rezeptor-Blocker bei der unilateralen Nierenarterienstenose positive Effekte hat. Sie tragen zum einen zur Stabilisierung des Blutdrucks bei und zum anderen verbessern sie die Funktion der kontralateralen Niere, indem sie eine kompensatorische Hyperfiltration und den Verlust der Integrität der Filtrationsbarriere verhindern.

## VIII. SUMMARY

Unilateral renal artery stenosis leads to reduced perfusion of the affected kidney and the resulting activation of the renin-angiotensin-aldosterone-system induces many serious secondary diseases. In the last years therapeutic options were discussed controversially and medical therapies are favored again. Especially inhibitors of the renin-angiotensin-aldosterone-system are successfully used.

Accordingly, in this study experiments were performed to evaluate kidney function after experimental induction of unilateral renal artery stenosis and the effects of AT<sub>1</sub>-receptor-blocker therapy were investigated. To simultaneously evaluate kidney function and morphology in the stenotic and the contralateral kidney multiphoton-microscopy was used. Surgical constriction of the renal artery was achieved by implantation of a stenotic clip. This caused a significant increase in systolic blood pressure, which was mainly prevented by the administration of the AT<sub>1</sub>-receptor-antagonist losartan (200 mg/L drinking water).

In the stenotic kidney unilateral constriction of the renal artery led to a significant decrease in glomerular and peritubular blood flow compared to sham-operated controls. Glomerular and peritubular blood flow in the contralateral kidney was elevated by 25 % and 20%, respectively, compared to control experiments. Losartan treatment did not influence glomerular and peritubular blood flow. The glomerular filtration and an intact filtration barrier are essential for a physiological kidney function. Albumin filtration can be calculated from these two parameters. Clinical studies observed a strong correlation between albuminuria and a decline in kidney function. Albuminuria can result from increased glomerular filtration and/or an inadequate reabsorption of albumin in the proximal tubules.

The glomerular filtration in the stenotic kidney was significantly reduced, whereas compensatory hyperfiltration was determined in the contralateral kidney. Hyperfiltration can lead to structural and functional changes in the kidney. Losartan treatment had protective effects on the development of hyperfiltration in the contralateral kidney, but did not affect the glomerular filtration rate in the stenotic kidney.

Under physiological conditions the glomerular filtration barrier of the glomerulus is almost impermeable to high molecular proteins such as albumin. The stenotic

kidney showed a significantly increased permeability of the glomerular filtration barrier for albumin, which could not be prevented by AT<sub>1</sub>-receptor blockade. The integrity of the glomerular filtration barrier was also altered in the contralateral kidney. However, losartan treatment was able to diminish the increased albumin filtration.

Moreover, animals with renal artery stenosis excrete larger amounts of albumin via the urine. The urinary albumin excretion of the stenotic and contralateral kidney was determined via a calculative approach. It can be concluded, that the excreted amount of albumin originates in equal parts from the stenotic and the contralateral kidney. In the stenotic kidney albuminuria is caused by tubular dysfunction, whereas in the contralateral kidney it is of glomerular origin. Losartan therapy decreased albuminuria by 20%.

In accordance with recent clinical studies this results show, that drug treatment with AT<sub>1</sub>-receptor blockers achieve beneficial effects in renal artery stenosis. They contribute to the normalization of blood pressure and secondly they improve kidney function of the contralateral kidney by preventing hyperfiltration and the loss of the integrity of the filtration barrier.

## IX. LITERATURVERZEICHNIS

Abdel-Rahman, E. M., Abadir, P. M. & Siragy, H. M. 2008. Regulation of renal 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in diabetes by angiotensin AT1 and AT2 receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **295**, R1473-8.

Adamczak, M. & Wiecek, A. 2012. Ischemic nephropathy - pathogenesis and treatment. *Nefrologia*, **32**, 432-8.

Atkins, R. C., Briganti, E. M., Lewis, J. B., Hunsicker, L. G., Braden, G., Champion de Crespigny, P. J., DeFerrari, G., Drury, P., Locatelli, F., Wiegmann, T. B. & Lewis, E. J. 2005. Proteinuria reduction and progression to renal failure in patients with type 2 diabetes mellitus and overt nephropathy. *Am J Kidney Dis*, **45**, 281-7.

Atlas, S. A. 2007. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm*, **13**, 9-20.

Bagnasco, S., Good, D., Balaban, R. & Burg, M. 1985. Lactate production in isolated segments of the rat nephron. *Am J Physiol*, **248**, F522-6.

Bax, L., Woittiez, A. J., Kouwenberg, H. J., Mali, W. P., Buskens, E., Beek, F. J., Braam, B., Huysmans, F. T., Schultze Kool, L. J., Rutten, M. J., Doorenbos, C. J., Aarts, J. C., Rabelink, T. J., Plouin, P. F., Raynaud, A., van Montfrans, G. A., *et al.* 2009. Stent placement in patients with atherosclerotic renal artery stenosis and impaired renal function: a randomized trial. *Ann Intern Med*, **150**, 840-8, W150-1.

Beladi-Mousavi, S. S., Alemzadeh-Ansari, M. J., Alemzadeh-Ansari, M. H. & Beladi-Mousavi, M. 2012. Long-term survival of patients with end-stage renal disease on maintenance hemodialysis: a multicenter study in Iran. *Iran J Kidney Dis*, **6**, 452-6.

Bianco, B. & Diaspro, A. 1989. Analysis of three-dimensional cell imaging obtained with optical microscopy techniques based on defocusing. *Cell Biophys*,

**15**, 189-99.

Bivol, L. M., Vagnes, O. B. & Iversen, B. M. 2005. The renal vascular response to ANG II injection is reduced in the nonclipped kidney of two-kidney, one-clip hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*, **289**, F393-400.

Bjornstad, P., Cherney, D. Z., Snell-Bergeon, J. K., Pyle, L., Rewers, M., Johnson, R. J. & Maahs, D. M. 2015. Rapid GFR decline is associated with renal hyperfiltration and impaired GFR in adults with Type 1 diabetes. *Nephrol Dial Transplant*, **30**, 1706-11.

Bonelli, F. S., McKusick, M. A., Textor, S. C., Kos, P. B., Stanson, A. W., Johnson, C. M., Sheedy, P. F., 2nd, Welch, T. J. & Schirger, A. 1995. Renal artery angioplasty: technical results and clinical outcome in 320 patients. *Mayo Clin Proc*, **70**, 1041-52.

Bounous, G. & Shumacker, H. B., Jr. 1962. Experimental unilateral renal artery stenosis. *Surg Gynecol Obstet*, **114**, 415-25.

Brown, C. P., Houle, M. A., Popov, K., Nicklaus, M., Couture, C. A., Laliberte, M., Brabec, T., Ruediger, A., Carr, A. J., Price, A. J., Gill, H. S., Ramunno, L. & Legare, F. 2013. Imaging and modeling collagen architecture from the nano to micro scale. *Biomed Opt Express*, **5**, 233-43.

Budde, K. 2003. Vaskuläre Nierenschädigung. *M. Dietel, J. Dudenhausen, N. Suttrop: Harrisons Innere Medizin 1, 15 Auflage, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin Leiben*, 1772-1777.

Cai, H. & Harrison, D. G. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, **87**, 840-4.

Canzanello, V. J., Millan, V. G., Spiegel, J. E., Ponce, P. S., Kopelman, R. I. & Madias, N. E. 1989. Percutaneous transluminal renal angioplasty in management

of atherosclerotic renovascular hypertension: results in 100 patients. *Hypertension*, **13**, 163-72.

Caps, M. T., Perissinotto, C., Zierler, R. E., Polissar, N. L., Bergelin, R. O., Tullis, M. J., Cantwell-Gab, K., Davidson, R. C. & Strandness, D. E., Jr. 1998. Prospective study of atherosclerotic disease progression in the renal artery. *Circulation*, **98**, 2866-72.

Castrop, H. 2013. Angiotensin receptor-associated proteins: local modulators of the renin-angiotensin system. *Pflugers Arch*, **465**, 111-9.

Castrop, H. 2016. Tubuloglomeruläres Feedback. *Der Nephrologe, Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.

Castrop, H., Hoherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V. & Wagner, C. 2010. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev*, **90**, 607-73.

Chang, R. L., Deen, W. M., Robertson, C. R. & Brenner, B. M. 1975. Permselectivity of the glomerular capillary wall: III. Restricted transport of polyanions. *Kidney Int*, **8**, 212-8.

Cheung, C. M., Hegarty, J. & Kalra, P. A. 2005. Dilemmas in the management of renal artery stenosis. *Br Med Bull*, **73-74**, 35-55.

Chrysochou, C. & Kalra, P. A. 2010. Current management of atherosclerotic renovascular disease--what have we learned from ASTRAL? *Nephron Clin Pract*, **115**, c73-81.

Clapp, W. L., Park, C. H., Madsen, K. M. & Tisher, C. C. 1988. Axial heterogeneity in the handling of albumin by the rabbit proximal tubule. *Lab Invest*, **58**, 549-58.

Cooper, C. J., Murphy, T. P., Cutlip, D. E., Jamerson, K., Henrich, W., Reid, D.



M., Cohen, D. J., Matsumoto, A. H., Steffes, M., Jaff, M. R., Prince, M. R., Lewis, E. F., Tuttle, K. R., Shapiro, J. I., Rundback, J. H., Massaro, J. M., *et al.* 2014. Stenting and medical therapy for atherosclerotic renal-artery stenosis. *N Engl J Med*, **370**, 13-22.

Currie, G. & Delles, C. 2013. Proteinuria and its relation to cardiovascular disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, **7**, 13-24.

Daemen, M. A., van 't Veer, C., Denecker, G., Heemskerk, V. H., Wolfs, T. G., Clauss, M., Vandenabeele, P. & Buurman, W. A. 1999. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest*, **104**, 541-9.

De Paolis, P., Porcellini, A., Gigante, B., Giliberti, R., Lombardi, A., Savoia, C., Rubattu, S. & Volpe, M. 1999. Modulation of the AT2 subtype receptor gene activation and expression by the AT1 receptor in endothelial cells. *J Hypertens*, **17**, 1873-7.

Deen, W. M. 2004. What determines glomerular capillary permeability? *J Clin Invest*, **114**, 1412-4.

Deen, W. M., Lazzara, M. J. & Myers, B. D. 2001. Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol*, **281**, F579-96.

Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, **248**, 73-6.

Diaspro, A., Bianchini, P., Vicidomini, G., Faretta, M., Ramoino, P. & Usai, C. 2006. Multi-photon excitation microscopy. *Biomed Eng Online*, **5**, 36.

Dickson, L. E., Wagner, M. C., Sandoval, R. M. & Molitoris, B. A. 2014. The proximal tubule and albuminuria: really! *J Am Soc Nephrol*, **25**, 443-53.

Dijkhorst-Oei, L. T., Strokes, E. S., Koomans, H. A. & Rabelink, T. J. 1999. Acute

simultaneous stimulation of nitric oxide and oxygen radicals by angiotensin II in humans in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol*, **33**, 420-4.

Dorros, G., Jaff, M., Mathiak, L., Dorros, II, Lowe, A., Murphy, K. & He, T. 1998. Four-year follow-up of Palmaz-Schatz stent revascularization as treatment for atherosclerotic renal artery stenosis. *Circulation*, **98**, 642-7.

Drexler, H. & Hornig, B. 1999. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol*, **31**, 51-60.

Dunn, K. W., Sandoval, R. M., Kelly, K. J., Dagher, P. C., Tanner, G. A., Atkinson, S. J., Bacallao, R. L. & Molitoris, B. A. 2002. Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**, C905-16.

el Nahas, A. M., Bassett, A. H., Cope, G. H. & Le Carpentier, J. E. 1991. Role of growth hormone in the development of experimental renal scarring. *Kidney Int*, **40**, 29-34.

Epstein, F. H. 1997. Oxygen and renal metabolism. *Kidney Int*, **51**, 381-5.

Ergin, B., Kapucu, A., Demirci-Tansel, C. & Ince, C. 2015. The renal microcirculation in sepsis. *Nephrol Dial Transplant*, **30**, 169-77.

Esler, M., Jennings, G., Korner, P., Willett, I., Dudley, F., Hasking, G., Anderson, W. & Lambert, G. 1988. Assessment of human sympathetic nervous system activity from measurements of norepinephrine turnover. *Hypertension*, **11**, 3-20.

European Stroke, O., Tendera, M., Aboyans, V., Bartelink, M. L., Baumgartner, I., Clement, D., Collet, J. P., Cremonesi, A., De Carlo, M., Erbel, R., Fowkes, F. G., Heras, M., Kownator, S., Minar, E., Ostergren, J., Poldermans, D., *et al.* 2011. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral,

mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, **32**, 2851-906.

Fassi, A., Sangalli, F., Maffi, R., Colombi, F., Mohamed, E. I., Brenner, B. M., Remuzzi, G. & Remuzzi, A. 1998. Progressive glomerular injury in the MWF rat is predicted by inborn nephron deficit. *J Am Soc Nephrol*, **9**, 1399-406.

Foy, A., Ruggiero, N. J., 2nd & Filippone, E. J. 2012. Revascularization in renal artery stenosis. *Cardiol Rev*, **20**, 189-93.

Gekle, Wischmeyer, Gründer, Petersen, Schwab, Markwardt, Klöcker, Pape, Baumann & Mari 2015. Taschenlehrbuch Physiologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, 331-334.

Gloviczki, M. L., Glockner, J. F., Lerman, L. O., McKusick, M. A., Misra, S., Grande, J. P. & Textor, S. C. 2010. Preserved oxygenation despite reduced blood flow in poststenotic kidneys in human atherosclerotic renal artery stenosis. *Hypertension*, **55**, 961-6.

Gobe, G. C., Axelsen, R. A. & Searle, J. W. 1990. Cellular events in experimental unilateral ischemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab Invest*, **63**, 770-9.

Goeppert-Mayer 1931. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* **9**, 273-295.

Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R. F. & Summerville, W. W. 1934. Studies on Experimental Hypertension : I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. *J Exp Med*, **59**, 347-79.

Grant, B. D. & Donaldson, J. G. 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 597-608.

Greco, B. A. & Breyer, J. A. 1997. Atherosclerotic ischemic renal disease. *Am J Kidney Dis*, **29**, 167-87.

Greten, H., Rinner, F. & Greten, T. 2010. Innere Medizin. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*.

Gunther, S., Gimbrone, M. A., Jr. & Alexander, R. W. 1980. Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels. *Nature*, **287**, 230-2.

Gupta, A., Rhodes, G. J., Berg, D. T., Gerlitz, B., Molitoris, B. A. & Grinnell, B. W. 2007. Activated protein C ameliorates LPS-induced acute kidney injury and downregulates renal INOS and angiotensin 2. *Am J Physiol Renal Physiol*, **293**, F245-54.

Hackam, D. G., Duong-Hua, M. L., Mamdani, M., Li, P., Tobe, S. W., Spence, J. D. & Garg, A. X. 2008. Angiotensin inhibition in renovascular disease: a population-based cohort study. *Am Heart J*, **156**, 549-55.

Hackbarth, H., Buttner, D., Jarck, D., Pothmann, M., Messow, C. & Gartner, K. 1983. Distribution of glomeruli in the renal cortex of Munich Wistar Fromter (MWF) rats. *Ren Physiol*, **6**, 63-71.

Hackbarth, H., Gwinner, W., Alt, J. M., Hagemann, I., Thiemann, A. & Finke, B. 1991. The Munich Wistar Fromter rat: proteinuria and blood pressure in correlation to the number of superficial glomeruli. *Ren Physiol Biochem*, **14**, 246-52.

Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D. & Taugner, R. 1990. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*, **70**, 1067-116.

Hansen, K. J., Edwards, M. S., Craven, T. E., Cherr, G. S., Jackson, S. A., Appel, R. G., Burke, G. L. & Dean, R. H. 2002. Prevalence of renovascular disease in the elderly: a population-based study. *J Vasc Surg*, **36**, 443-51.

Hansson, L., Lindholm, L. H., Ekblom, T., Dahlöf, B., Lanke, J., Schersten, B., Wester, P. O., Hedner, T. & de Faire, U. 1999. Randomised trial of old and new antihypertensive drugs in elderly patients: cardiovascular mortality and morbidity the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension-2 study. *Lancet*, **354**, 1751-6.

Haraldsson, B., Nystrom, J. & Deen, W. M. 2008. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev*, **88**, 451-87.

Hassell, J. R., Robey, P. G., Barrach, H. J., Wilczek, J., Rennard, S. I. & Martin, G. R. 1980. Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 4494-8.

Hegde, L. G., Srivastava, P., Kumari, R. & Dikshit, M. 1998. Alterations in the vasoreactivity of hypertensive rat aortic rings: role of nitric oxide and superoxide radicals. *Clin Exp Hypertens*, **20**, 885-901.

Helal, I., Fick-Brosnahan, G. M., Reed-Gitomer, B. & Schrier, R. W. 2012. Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Nephrol*, **8**, 293-300.

Helmchen, F. & Denk, W. 2005. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, **2**, 932-40.

Helmy, M., Gohda, J., Inoue, J., Tomita, M., Tsuchiya, M. & Selvarajoo, K. 2009. Predicting novel features of toll-like receptor 3 signaling in macrophages. *PLoS One*, **4**, e4661.

Herold 2006. Arterielle Hypertonie. *Innere Medizin*, 259-271.

Higashi, Y., Sasaki, S., Nakagawa, K., Matsuura, H., Oshima, T. & Chayama, K. 2002. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med*, **346**, 1954-62.

Huber, T. B., Simons, M., Hartleben, B., Sernetz, L., Schmidts, M., Gundlach, E., Saleem, M. A., Walz, G. & Benzing, T. 2003. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet*, **12**, 3397-405.

Hunsicker, L. G., Adler, S., Caggiula, A., England, B. K., Greene, T., Kusek, J. W., Rogers, N. L. & Teschan, P. E. 1997. Predictors of the progression of renal disease in the Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney Int*, **51**, 1908-19.

Investigators, A., Wheatley, K., Ives, N., Gray, R., Kalra, P. A., Moss, J. G., Baigent, C., Carr, S., Chalmers, N., Eadington, D., Hamilton, G., Lipkin, G., Nicholson, A. & Scoble, J. 2009. Revascularization versus medical therapy for renal-artery stenosis. *N Engl J Med*, **361**, 1953-62.

Iversen, B. M., Heyeraas, K. J., Sekse, I., Andersen, K. J. & Ofstad, J. 1986. Autoregulation of renal blood flow in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol*, **251**, F245-50.

Jin, X. Q., Fukuda, N., Su, J. Z., Lai, Y. M., Suzuki, R., Tahira, Y., Takagi, H., Ikeda, Y., Kanmatsuse, K. & Miyazaki, H. 2002. Angiotensin II type 2 receptor gene transfer downregulates angiotensin II type 1a receptor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **39**, 1021-7.

Johansson, M., Elam, M., Rundqvist, B., Eisenhofer, G., Herlitz, H., Lambert, G. & Friberg, P. 1999. Increased sympathetic nerve activity in renovascular hypertension. *Circulation*, **99**, 2537-42.

Johnsson, E., Rippe, B. & Haraldsson, B. 1994. Reduced permselectivity in isolated perfused rat kidneys following small elevations of glomerular capillary pressure. *Acta Physiol Scand*, **150**, 201-9.

Kaiser & Garrett 1961. Two-Photon Excitation  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ . *Physical Review Letters* **7** (6), 229-231.

Keddis, M. T., Garovic, V. D., Bailey, K. R., Wood, C. M., Raissian, Y. & Grande, J. P. 2010. Ischaemic nephropathy secondary to atherosclerotic renal artery stenosis: clinical and histopathological correlates. *Nephrol Dial Transplant*, **25**, 3615-22.

Kidney, D. D. & Deutsch, L. S. 1996. The indications and results of percutaneous transluminal angioplasty and stenting in renal artery stenosis. *Semin Vasc Surg*, **9**, 188-97.

Klüting, A. 1997. Losartan und Valsartan, zwei AT1-Antagonisten. *Pharmazeutische Zeitung, GOVI Verlag, München*.

Kribben, Lang, Heemann & Philipp, T. 1998. Diagnostisches Vorgehen bei Nierenarterienstenose. *Fortschritte der Medizin*, **116**, 35-38.

Krumme 2001. Nierenarterienstenose - Behandeln oder nicht? *Cardiovasc*, **1**, 20-24.

Kuhlmann, U., Luft, F. C. & Walb, D. 2003. Nephrologie: Pathophysiologie – Klinik – Nierenersatzverfahren. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*.

Lerman, L. O., Nath, K. A., Rodriguez-Porcel, M., Krier, J. D., Schwartz, R. S., Napoli, C. & Romero, J. C. 2001. Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension*, **37**, 541-6.

Lerman, L. O., Textor, S. C. & Grande, J. P. 2009. Mechanisms of tissue injury in renal artery stenosis: ischemia and beyond. *Prog Cardiovasc Dis*, **52**, 196-203.

Liang, P., Hurks, R., Bensley, R. P., Hamdan, A., Wyers, M., Chaikof, E. & Schermerhorn, M. L. 2013. The rise and fall of renal artery angioplasty and stenting in the United States, 1988-2009. *J Vasc Surg*, **58**, 1331-8 e1.

Lund, U., Rippe, A., Venturoli, D., Tenstad, O., Grubb, A. & Rippe, B. 2003.

Glomerular filtration rate dependence of sieving of albumin and some neutral proteins in rat kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol*, **284**, F1226-34.

Lupu, A. N. & Maxwell, M. H. 1972. Unilateral renovascular hypertension in the dog. *Adv Nephrol Necker Hosp*, **2**, 165-79.

Maack, Park & Camargo 1992. The Kidney: Physiology and Pathophysiology, Chapter: Renal filtration, transport and metabolism of proteins. *New York: Raven*, **77**, 3005-3038.

Magee, G. M., Bilous, R. W., Cardwell, C. R., Hunter, S. J., Kee, F. & Fogarty, D. G. 2009. Is hyperfiltration associated with the future risk of developing diabetic nephropathy? A meta-analysis. *Diabetologia*, **52**, 691-7.

Makanjuola, A. D., Suresh, M., Laboi, P., Kalra, P. A. & Scoble, J. E. 1999. Proteinuria in atherosclerotic renovascular disease. *QJM*, **92**, 515-8.

Martin, Rees & O'Bryant 1994. Percutaneous angioplasty of the renal arteries. *Vascular diseases: surgical & interventional therapy*, 3rd ed. New York; Churchill Livingstone, 721-41.

Matejovic, M., Ince, C., Chawla, L. S., Blantz, R., Molitoris, B. A., Rosner, M. H., Okusa, M. D., Kellum, J. A., Ronco, C. & Group, A. X. W. 2016. Renal Hemodynamics in AKI: In Search of New Treatment Targets. *J Am Soc Nephrol*, **27**, 49-58.

Mayer, G. 2005. Proteinurie und Progression von Nierenerkrankungen. *Nephro-News, Forum für Nephrologie und Hypertensiologie*.

McLaughlin, K., Jardine, A. G. & Moss, J. G. 2000. ABC of arterial and venous disease. Renal artery stenosis. *BMJ*, **320**, 1124-7.

Mehta, P. K. & Griendling, K. K. 2007. Angiotensin II cell signaling:



physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*, **292**, C82-97.

Merin, R. G. 1977. Effect of anesthetic drugs on myocardial performance in man. *Annu Rev Med*, **28**, 75-83.

Meyrier, A., Hill, G. S. & Simon, P. 1998. Ischemic renal diseases: new insights into old entities. *Kidney Int*, **54**, 2-13.

Middeke 2005. Arterielle Hypertonie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, 108.

Miksche, L. W., Miksche, U. & Gross, F. 1970. Effect of sodium restriction on renal hypertension and on renin activity in the rat. *Circ Res*, **27**, 973-84.

Missouris, C. G., Buckenham, T., Cappuccio, F. P. & MacGregor, G. A. 1994. Renal artery stenosis: a common and important problem in patients with peripheral vascular disease. *Am J Med*, **96**, 10-4.

Miyajima, E., Yamada, Y., Yoshida, Y., Matsukawa, T., Shionoiri, H., Tochikubo, O. & Ishii, M. 1991. Muscle sympathetic nerve activity in renovascular hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension*, **17**, 1057-62.

Miyajima, T., Yokoyama, H., Taira, H. & Tsuji, Y. 2005. Quantitative estimation of renal blood flow by power Doppler ultrasonography in renovascular hypertensive dogs. *Kidney Int*, **68**, 2781-6.

Miyata, N., Park, F., Li, X. F. & Cowley, A. W., Jr. 1999. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol*, **277**, F437-46.

Mochizuki, T., Lemmink, H. H., Mariyama, M., Antignac, C., Gubler, M. C., Pirson, Y., Verellen-Dumoulin, C., Chan, B., Schroder, C. H., Smeets, H. J. & et al. 1994. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen

genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet*, **8**, 77-81.

Molitoris, B. A. 2005. Renal blood flow in sepsis: a complex issue. *Crit Care*, **9**, 327-8.

Molitoris, B. A. 2014. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. *J Clin Invest*, **124**, 2355-63.

Molitoris, B. A. & Sutton, T. A. 2004. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int*, **66**, 496-9.

Müller-Oerlinghausen, B., Lasek, R., Düppenbecker, H. & Munter, K. H. 1999. Handbuch der unerwünschten Arzneimittelwirkungen. *Urban & Fischer, München*.

Murphy, W. R., Coleman, T. G., Smith, T. L. & Stanek, K. A. 1984. Effects of graded renal artery constriction on blood pressure, renal artery pressure, and plasma renin activity in Goldblatt hypertension. *Hypertension*, **6**, 68-74.

Oheim, M., Michael, D. J., Geisbauer, M., Madsen, D. & Chow, R. H. 2006. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Adv Drug Deliv Rev*, **58**, 788-808.

Ohlson, M., Sorensson, J., Lindstrom, K., Blom, A. M., Fries, E. & Haraldsson, B. 2001. Effects of filtration rate on the glomerular barrier and clearance of four differently shaped molecules. *Am J Physiol Renal Physiol*, **281**, F103-13.

Pape, Kurtz & Silbernagl 2014. Physiologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*.

Park, S., Jung, J. H., Seo, H. S., Ko, Y. G., Choi, D., Jang, Y., Chung, N., Cho, S. Y. & Shim, W. H. 2004. The prevalence and clinical predictors of atherosclerotic renal artery stenosis in patients undergoing coronary angiography. *Heart Vessels*, **19**, 275-9.

Pavenstadt, H., Kriz, W. & Kretzler, M. 2003. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*, **83**, 253-307.

Payami, B., Jafarizade, M., Beladi Mousavi, S. S., Sattari, S. A. & Nokhostin, F. 2016. Prevalence and predictors of atherosclerotic renal artery stenosis in hypertensive patients undergoing simultaneous coronary and renal artery angiography; a cross-sectional study. *J Renal Inj Prev*, **5**, 34-8.

Peti-Peterdi, J., Morishima, S., Bell, P. D. & Okada, Y. 2002. Two-photon excitation fluorescence imaging of the living juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol Renal Physiol*, **283**, F197-201.

Plouin, P. F., Perdu, J., La Batide-Alanore, A., Boutouyrie, P., Gimenez-Roqueplo, A. P. & Jeunemaitre, X. 2007. Fibromuscular dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*, **2**, 28.

Pohl 1999. Renovascular Hypertension and Ischemic Nephropathy. Chapter 3 in *Atlas of Diseases of the Kidney, Current Medicine by Robert W. Schrier*.

Polak, W. G., Jezior, D., Garcarek, J., Chudoba, P., Patrzalek, D., Boratynska, M., Szyber, P. & Klinger, M. 2006. Incidence and outcome of transplant renal artery stenosis: single center experience. *Transplant Proc*, **38**, 131-2.

Racoosin, E. L. & Swanson, J. A. 1993. Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J Cell Biol*, **121**, 1011-20.

Radermacher, J., Chavan, A., Bleck, J., Vitzthum, A., Stoess, B., Gebel, M. J., Galanski, M., Koch, K. M. & Haller, H. 2001. Use of Doppler ultrasonography to predict the outcome of therapy for renal-artery stenosis. *N Engl J Med*, **344**, 410-7.

Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B. A., Griendling, K. K. & Harrison, D. G. 1996. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat

increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*, **97**, 1916-23.

Rammer, Kramar & Eber 2007. Atherosklerotische Nierenarterienstenose. *Deutsche medizinische Wochenschrift, Nephrologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York*.

Remuzzi, A., Puntorieri, S., Mazzoleni, A. & Remuzzi, G. 1988. Sex related differences in glomerular ultrafiltration and proteinuria in Munich-Wistar rats. *Kidney Int*, **34**, 481-6.

Remuzzi, G., Perico, N., Macia, M. & Ruggenti, P. 2005. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*, S57-65.

Rippe, B. & Haraldsson, B. 1994. Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. *Physiol Rev*, **74**, 163-219.

Rizzoni, D., Porteri, E., Castellano, M., Bettoni, G., Muiesan, M. L., Tiberio, G., Giulini, S. M., Rossi, G., Bernini, G. & Agabiti-Rosei, E. 1998. Endothelial dysfunction in hypertension is independent from the etiology and from vascular structure. *Hypertension*, **31**, 335-41.

Robert Koch Institut, H. 2014. Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2012", Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, RKI, Berlin.

Ruggenti, P., Cravedi, P. & Remuzzi, G. 2012. Mechanisms and treatment of CKD. *J Am Soc Nephrol*, **23**, 1917-28.

Safian, R. D. & Textor, S. C. 2001. Renal-artery stenosis. *N Engl J Med*, **344**, 431-42.

Salant, D. J. 1994. The structural biology of glomerular epithelial cells in proteinuric diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **3**, 569-74.

Sawicki, P. T., Kaiser, S., Heinemann, L., Frenzel, H. & Berger, M. 1991. Prevalence of renal artery stenosis in diabetes mellitus--an autopsy study. *J Intern Med*, **229**, 489-92.

Schiessl, I. M., Bardehle, S. & Castrop, H. 2013. Superficial nephrons in BALB/c and C57BL/6 mice facilitate in vivo multiphoton microscopy of the kidney. *PLoS One*, **8**, e52499.

Schiessl, I. M. & Castrop, H. 2013. Angiotensin II AT2 receptor activation attenuates AT1 receptor-induced increases in the glomerular filtration of albumin: a multiphoton microscopy study. *Am J Physiol Renal Physiol*, **305**, F1189-200.

Schiessl, I. M., Hammer, A., Riquier-Brison, A. & Peti-Peterdi, J. 2016. Just Look! Intravital Microscopy as the Best Means to Study Kidney Cell Death Dynamics. *Semin Nephrol*, **36**, 220-36.

Schiessl, I. M., Kattler, V. & Castrop, H. 2015. In vivo visualization of the antialbuminuric effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril. *J Pharmacol Exp Ther*, **353**, 299-306.

Schmidt, R. F., Lang, F. & Thews, G. 2005. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. *Springer Medizin Verlag, Heidelberg*.

Schnermann & Sayegh 1998. Kidney Physiology. *Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia*.

Schock-Kusch, D., Xie, Q., Shulhevich, Y., Hesser, J., Stsepankou, D., Sadick, M., Koenig, S., Hoecklin, F., Pill, J. & Gretz, N. 2011. Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-sinistrin disappearance curves. *Kidney Int*, **79**, 1254-8.

Schreiber, M. J., Pohl, M. A. & Novick, A. C. 1984. The natural history of atherosclerotic and fibrous renal artery disease. *Urol Clin North Am*, **11**, 383-92.

Schwietzer, G. & Gertz, K. H. 1979. Changes of hemodynamics and glomerular ultrafiltration in renal hypertension of rats. *Kidney Int*, **15**, 134-43.

Segrest, J. H. & Hillegass, W. B. 2015. Renal artery stenting: patient selection post-CORAL. *Catheter Cardiovasc Interv*, **86**, 310-1.

Sharma, M., Sharma, R., Greene, A. S., McCarthy, E. T. & Savin, V. J. 1998. Documentation of angiotensin II receptors in glomerular epithelial cells. *Am J Physiol*, **274**, F623-7.

Simionescu, M. & Antohe, F. 2006. Functional ultrastructure of the vascular endothelium: changes in various pathologies. *Handb Exp Pharmacol*, 41-69.

Simon, G. 2000. What is critical renal artery stenosis? Implications for treatment. *Am J Hypertens*, **13**, 1189-93.

Siragy, H. M. 2009. The potential role of the angiotensin subtype 2 receptor in cardiovascular protection. *Curr Hypertens Rep*, **11**, 260-2.

Siragy, H. M., Inagami, T., Ichiki, T. & Carey, R. M. 1999. Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6506-10.

Skeggs, L. T., Dorer, F. E., Kahn, J. R., Lentz, K. E. & Levine, M. 1976. The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension. *Am J Med*, **60**, 737-48.

Skrtic, M., Lytvyn, Y., Yang, G. K., Yip, P., Lai, V., Silverman, M. & Cherney, D. Z. 2015. Glomerular haemodynamic profile of patients with Type 1 diabetes compared with healthy control subjects. *Diabet Med*, **32**, 972-9.

Sos, T. A., Pickering, T. G., Saddekni, S., Srur, M., Case, D. B., Silane, M. F., Vaughan, E. D., Jr. & Laragh, J. H. 1984. The current role of renal angioplasty in the treatment of renovascular hypertension. *Urol Clin North Am*, **11**, 503-13.

Sturm, W. 2008. Zufallsbefund Nierenarterienstenose. *Journal of Cardiology, Austria*, **15**, 61-64.

Taal, M. W. & Brenner, B. M. 2000. Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int*, **57**, 1803-17.

Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Magagna, A. & Salvetti, A. 1998. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*, **97**, 2222-9.

Taddei, S., Virdis, A., Mattei, P. & Salvetti, A. 1993. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*, **21**, 929-33.

Tamadon, M. R. & Beladi-Mousavi, S. S. 2013. Erythropoietin; a review on current knowledge and new concepts. *J Renal Inj Prev*, **2**, 119-21.

Tegtmeyer, C. J., Elson, J., Glass, T. A., Ayers, C. R., Chevalier, R. L., Wellons, H. A., Jr. & Studdard, W. E., Jr. 1982. Percutaneous transluminal angioplasty: the treatment of choice for renovascular hypertension due to fibromuscular dysplasia. *Radiology*, **143**, 631-7.

Textor, S. C. 1990. ACE inhibitors in renovascular hypertension. *Cardiovasc Drugs Ther*, **4**, 229-35.

Textor, S. C. & Wilcox, C. S. 2001. Renal artery stenosis: a common, treatable cause of renal failure? *Annu Rev Med*, **52**, 421-42.

Tisher, C. C. 1978. Functional anatomy of the kidney. *Hosp Pract*, **13**,

UNKNOWN.

Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Masaki, H., Kurihara, H., Murasawa, S., Takai, S., Miyazaki, M., Nozawa, Y., Ozono, R., Nakagawa, K., Miwa, T., Kawada, N., Mori, Y., Shibasaki, Y., Tanaka, Y., Fujiyama, S., *et al.* 1999. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest*, **104**, 925-35.

Wagner, H. & Fischereder, M. 2011. Innere Medizin für Zahnmediziner. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, 145.

Warner, L., Gomez, S. I., Bolterman, R., Haas, J. A., Bentley, M. D., Lerman, L. O. & Romero, J. C. 2009. Regional decreases in renal oxygenation during graded acute renal arterial stenosis: a case for renal ischemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **296**, R67-71.

Williams, G. H. 2003. Hypertensive Gefäßerkrankung Dietel, M., Dudenhausen, J., Suttorp, N.: *Harrisons Innere Medizin 2*;

15. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin Leiben. *Dietel, M., Dudenhausen, J., Suttorp, N.: Harrisons Innere Medizin 2*;

15. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin Leiben, 1555-1570.

Wright, J. R., Duggal, A., Thomas, R., Reeve, R., Roberts, I. S. & Kalra, P. A. 2001. Clinicopathological correlation in biopsy-proven atherosclerotic nephropathy: implications for renal functional outcome in atherosclerotic renovascular disease. *Nephrol Dial Transplant*, **16**, 765-70.

Yang, G. K., Maahs, D. M., Perkins, B. A. & Cherney, D. Z. 2013. Renal hyperfiltration and systemic blood pressure in patients with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *PLoS One*, **8**, e68908.

Yu, M. S., Folt, D. A., Drummond, C. A., Haller, S. T., Cooper, E. L., Brewster, P., Evans, K. L. & Cooper, C. J. 2014. Endovascular versus medical therapy for



---

atherosclerotic renovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*, **16**, 459.

## **X. ANHANG**

### **1. Publikationen**

Schiessl, I. M., Hammer, A., Kattler, V., Gess, B., Theilig, F., Witzgall, R. & Castrop, H. 2016a. Intravital Imaging Reveals Angiotensin II-Induced Transcytosis of Albumin by Podocytes. J Am Soc Nephrol, 27, 731-44.

Schiessl, I. M., Hammer, A., Riquier-Brison, A. & Peti-Peterdi, J. 2016. Just Look! Intravital Microscopy as the Best Means to Study Kidney Cell Death Dynamics. Semin Nephrol, 36, 220-36.

Grill, A., Schiessl, I. M., Gess, B., Fremter, K., Hammer, A. & Castrop, H. 2016. Salt-Losing Nephropathy in Mice with a Null Mutation of the Clcnk2 Gene. Acta Physiol (Oxf).

### **2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

**Abbildung 1: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System** (modifiziert nach Rad, 2006)

**Abbildung 2: Zusammenhang zwischen einer Nierenarterienstenose, Bluthochdruck und Niereninsuffizienz** (modifiziert nach Safian und Textor, 2001)

**Abbildung 3: Progression einer atherosklerotischen Nierenarterienstenose** (modifiziert nach Safian und Textor, 2001)

**Abbildung 4: Phasen der Goldblatt-Hypertonie** (modifiziert nach Pohl, 1999)

**Abbildung 5: Stokes-Verschiebung** (modifiziert nach Sobarwiki, 2013)

**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Energieniveaus bei Fluoreszenzanregung** (Jablonski-Schema, modifiziert nach Diaspro et al, 2006)

**Abbildung 7: Schematische Darstellung des optischen Lichtwegs bei konfokaler (A) und Multiphotonen-Mikroskopie (B)** (modifiziert nach Diaspro et al., 2006)

**Abbildung 8: Messung der Blutflussgeschwindigkeit**

**Abbildung 9: Bestimmung des Glomerulären Siebkoeffizienten von Albumin**

**Abbildung 10: Entwicklung des Körpergewichts**

**Abbildung 11: Systolischer Blutdruck der sechs Wochen alten Versuchstiere**

**Abbildung 12: Systolischer Blutdruck sechs Monate alter Tiere**

**Abbildung 13: Albumin-Osmolalitäts-Quotient der sechs Wochen alten Tiere**

**Abbildung 14: Albumin-Osmolalitäts-Quotient der sechs Monate alten Ratten**

**Abbildung 15: Glomerulosklerotische Veränderungen**

**Abbildung 16: Durchschnittliche Tiefe der 30 oberflächlichsten Glomeruli unter der Nierenkapsel**

**Abbildung 17: Multiphotonen-mikroskopische Aufnahmen**

**Abbildung 18: Systolische Blutdruckmessung**

**Abbildung 19: Einfluss von Losartan auf den systolischen Blutdruck**

**Abbildung 20: Mittlerer arterieller Blutdruck unter Isoflurannarkose**

**Abbildung 21: Peritubulär-kapilläre Blutflussgeschwindigkeit und Blutfluss**

**Abbildung 22: peritubuläre Blutflussgeschwindigkeit und Blutfluss unter der Behandlung mit Losartan**

**Abbildung 23: glomerulär-kapilläre Blutflussgeschwindigkeit und Blutfluss**

**Abbildung 24: glomerulär-kapilläre Blutflussgeschwindigkeit**

**Abbildung 25: glomerulär-kapillärer Blutfluss unter der Therapie mit Losartan**

**Abbildung 26: Einzelnephron-GFR**

**Abbildung 27: Einzelnephron-GFR der kontralateralen Niere**

**Abbildung 28: Einzelnephron-GFR der stenotischen Niere**

**Abbildung 29: Effekte einer einseitigen Nierenarterienstenose auf den  $GSC_A$**

**Abbildung 30:  $GSC_A$**

**Abbildung 31: Albuminfiltration im 2K1C-Modell**

**Abbildung 32: Albuminfiltration unter  $AT_1$ -Rezeptor Blockade im 2K1C-Modell**

**Abbildung 33: Rückresorption von Albumin im S1-Segment des proximalen Tubulus**

**Abbildung 34: Albuminrückresorption im S1-Segment unter der Therapie mit Losartan**

**Abbildung 35: Coomassie-gefärbtes SDS-Page-Gel**

**Abbildung 36: Quantitative Analyse der Albuminausscheidung im Urin**

**Abbildung 37: Albuminausscheidung unter Losartanbehandlung**

**Abbildung 38: peritubuläre Extravasation von FITC-Albumin in das Interstitium**

**Abbildung 39: Grad der peritubulären Extravasation von FITC Albumin in das Interstitium unter Losartanbehandlung**

**Abbildung 40: Schema der Albuminausscheidung der stenotischen und kontralateralen Niere im 2K1C-Modell**

**Tabelle 1: Klinische Hinweise auf eine renovaskuläre Hypertonie (modifiziert nach (Safian and Textor, 2001))**

**Tabelle 2: Glomerulosklerose-Index**

**Tabelle 3: Glomeruläre Filtrationsrate in sechs Wochen alten Tieren**

**Tabelle 4: Glomeruläre Filtrationsrate in sechs Monate alten Tieren**

### 3. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
2K1C	Two-Kidney-One-Clip (Modell der unilateralen Nierenarterienstenose)
A.	Arteria
Aa.	Ateriae
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting-Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANGI	Angiotensin I
ANGII	Angiotensin II
ARB	Angiotensin-Rezeptor-Blocker
AT <sub>1</sub>	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT <sub>2</sub>	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
bzw.	beziehungsweise
BD	Blutdruck
BSA	Rinderalbumin
d	Tag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (et alii)
FITC	Fluoresceinisoithiocyanat
FU	Einheit der Fluoreszenzintensität
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm

---

GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
ggr.	geringgradig
GSC <sub>A</sub>	Glomerulärer Siebkoeffizient von Albumin
h	Stunde
H	Proton
H&E	Hämatoxylin-Eosin (Färbung)
HXP-Lampe	Fluoreszenzlampe
I.E.	internationale Einheit
i.v.	intravenös
K	Kalium
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
LOS	Losartan
LY	Lucifer Yellow
M	molar
min	Minuten
ml, µl	Milli-, Mikroliter
mg	Milligramm
mmHg	Druckeinheit, 1mmHg = Druck, den 1 mm Quecksilbersäule anhebt
mol	Stoffmenge, mol = 6,02214129x10 <sup>23</sup> Teilchen
MPM	Multiphotonen-Mikroskopie
MWF	Munich Wistar Frömter
NaCl	Natriumchlorid

---

NAST	unilaterale Nierenarterienstenose
NIC-Kidney	nicht-invasives Clearencemessgerät
n.s.	nicht signifikant
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OP	Operation
PAS-Reaktion	Periodic acid-schiff reaction
PBS	Phosphate-buffered saline
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
post (p)	nach
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
PTA(S)	perkutane transluminale Angioplaste mit oder ohne Stentimplantation
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.c.	subkutan
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
USP	Fadenstärke nach dem USP-System (United States Pharmacopeia)
V.	Vena
Vv.	Venae
Vol%	Volumenprozent

vs.                      vergleiche

z.B.                    zum Beispiel

#### **4.            Erklärungen zum Copyright**

**Abbildung 1:** Der Urheber der Darstellung erlaubt freundlicherweise die Übernahme und Veröffentlichung in Dissertationsschriften.

(Originalartikel: [https://en.wikipedia.org/wiki/Renin-angiotensin\\_system](https://en.wikipedia.org/wiki/Renin-angiotensin_system))

**Abbildung 2 und 3, Tabelle 1:** Die Zeitschrift „New England Journal of Medicine“ erlaubt freundlicherweise die Übernahme einzelner Abbildungen zur Veröffentlichung in Dissertationsschriften.

(Originalartikel: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200102083440607>)

**Abbildung 4:** Die Wiley-Blackwell Verlagsgruppe erlaubt freundlicherweise die Veröffentlichung der Abbildung in meiner Dissertationsschrift. Die Originalabbildung erschien 1999 im Band Nr. 3 des „Atlas of Diseases of the Kidney“ von Robert W. Schrier. Die Originalabbildung wurde von Marc A. Pohl erstellt und im Kapitel Nr. 3 „Hypertension and the Kidney“ gezeigt.

(Originalabbildung:

[http://www.cybernephrology.ualberta.ca/cn/Schrier/Volume3/chapte3/ADK3-03\\_1-3.QXD.pdf](http://www.cybernephrology.ualberta.ca/cn/Schrier/Volume3/chapte3/ADK3-03_1-3.QXD.pdf))

**Abbildung 5:** Der Urheber (Sobarwiki) und Wikipedia erlauben freundlicherweise die Übernahme und Veröffentlichung dieser Abbildung.

(Originalabbildung: [https://en.wikipedia.org/wiki/Stokes\\_shift](https://en.wikipedia.org/wiki/Stokes_shift))

**Abbildung 6 und 7:** Die Zeitschrift „BioMed Engineering Online“ erlaubt freundlicherweise die Übernahme einzelner Abbildungen zur Veröffentlichung in Dissertationsschriften.

(Originalartikel: <http://biomedical-engineering-online.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-925X-5-36>)



## **XII. DANKSAGUNG**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Castrop für die Überlassung des interessanten Themas und seine hervorragende Betreuung bei der Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Ich danke Herrn Professor Dr. Wanke für die Übernahme der Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und seine freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. Schweda, für seine Unterstützung beim Erlernen der Implantation eines Stenoseklips.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Kolleginnen und Kollegen an der Universität Regensburg, für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit. Im Besonderen möchte ich Frau Dr. Schiessl für ihre Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit danken. Ohne ihre kompetente Anleitung wäre diese faszinierende Reise durch die Welt der Multiphotonen-Mikroskopie nicht möglich gewesen.

Frau Katharina Fremter danke ich für Unterstützung bei den Blutdruckmessungen und für ihr geduldiges Händchen im Umgang mit meinen Versuchstieren.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Bernhard Gess für die stets gute Zusammenarbeit und die Mithilfe bei der Albuminquantifizierung.

Ein herzlicher Dank gilt auch Herrn De Vries für die Einführung am LSM 710.

Frau Dr. Ebert, Alexandra Grill und Janina Staffel danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und konstruktive Kritik bei der Fertigstellung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinem Freund Wolfgang für seine Geduld und Motivation gerade in schwierigen Phasen dieser Arbeit.